

TESIS DOCTORAL

**Estudio de parámetros alternativos como indicadores del
envejecimiento y de la calidad del brandy de Jerez**

Cristina Martínez Montero

© Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz
El Autor

Edita: Servicio de Publicaciones de la Universidad de Cádiz
C/ Doctor Marañón, 3. 11002 Cádiz
www.uca.es/publicaciones
publicaciones@uca.es

ISBN: 978-84-9828-116-3



La composición del *Brandy de Jerez* va a venir dada por su forma de elaboración y especialmente por su sistema de envejecimiento dinámico, por Soleras y Criaderas. Por tanto, son múltiples los parámetros que pueden participar en la caracterización y tipificación de los Brandies de Jerez.

ESTUDIO DE PARÁMETROS ALTERNATIVOS COMO INDICADORES DEL ENVEJECIMIENTO Y DE LA CALIDAD DEL *BRANDY DE JEREZ*



Cristina Martínez Montero
Septiembre, 2006

**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA ANALÍTICA
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ**



**ESTUDIO DE PARÁMETROS
ALTERNATIVOS COMO INDICADORES DEL
ENVEJECIMIENTO Y DE LA CALIDAD DEL
*BRANDY DE JEREZ***

TESIS DOCTORAL
CÁDIZ, SEPTIEMBRE 2006

CRISTINA MARTÍNEZ MONTERO

**MEMORIA PRESENTADA POR LA LICENCIADA
CRISTINA MARTÍNEZ MONTERO
PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA POR LA
UNIVERSIDAD DE CÁDIZ**

FDO.: CRISTINA MARTÍNEZ MONTERO

Dr. D. Dominico A. Guillén y Dra. Dña. M^a. Carmen Rodríguez Dodero, Profesores del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

CERTIFICAN:

Que el presente trabajo de investigación titulado “ESTUDIO DE PARÁMETROS ALTERNATIVOS COMO INDICADORES DEL ENVEJECIMIENTO Y DE LA CALIDAD DEL *BRANDY DE JEREZ*”, ha sido realizado bajo su dirección por D^a. Cristina Martínez Montero para optar al grado de Doctora por la Universidad de Cádiz.

Y para que conste, expiden y firman la presente certificación
En Puerto Real, a 20 de julio de 2006

Fdo.: Dr. D. Dominico A. Guillén

Fdo.: Dra. Dña. M. Carmen Rodríguez

Dr. D. José Luís Hidalgo Hidalgo de Cisneros, Profesor de Química Analítica y Director del Departamento de Química Analítica de la Universidad de Cádiz

CERTIFICA:

Que el presente trabajo de investigación titulado “ESTUDIO DE PARÁMETROS ALTERNATIVOS COMO INDICADORES DEL ENVEJECIMIENTO Y DE LA CALIDAD DEL *BRANDY DE JEREZ*”, constituye la memoria que presenta D^a. Cristina Martínez Montero para optar al grado de Doctora por la Universidad de Cádiz, habiéndose realizado la investigación en el Departamento de Química Analítica de esta Universidad bajo la dirección de los profesores Dr. D. Dominico A. Guillén y Dra. Dña. M. Carmen Rodríguez.

Y para que conste, expido y firmo la presente certificación
En Puerto Real, a 20 de julio de 2006

Fdo.: Dr. D. José Luís Hidalgo Hidalgo de Cisneros

AGRADECIMIENTOS

A Mari Carmen, Dominico y Carmelo, por confiar en mi trabajo y permitirme hacer esta tesis. Por tantas explicaciones sobre el brandy, por vuestro apoyo. Gracias Mari Carmen, por quedar conmigo tantas veces para que te preguntara dudas, por tus consejos, por corregirme varias veces este trabajo y tantos otros... Gracias Domi, por esa tranquilidad contagiosa, por contarme tantas cosas del brandy, por tus ideas cuando todo fallaba, espero no haberte estresado mucho con la tesis. Gracias Carmelo, por confiarme el review, por permitirme trabajar en este grupo, por corregirme esta tesis.

A Igartuburu, Miguel y Cefe, por prestarme el equipo de azúcares.

A Emiliano, de los Servicios Centrales, por su ayuda con el equipo de gases y por su compañía en época de pinchazos.

A Andrés Jiménez, del CITY, por responder mis insistentes consultas de estadística, por orientarme sobre lo que era *estadísticamente* correcto.

A los compañer@s del grupo: Alí, Ángeles, Gerardo, Kike, Machú, Maitée, Manolo, María Jesús (Ciudad Real), Mauricio, Miguel, Mónica, Patricia, Ramón, Raquel, Reme, Valme, Zulema. Por vuestra compañía, por vuestra ayuda, por hacerme cortas las largas horas de la parte experimental. Por preguntarme por la tesis y recordarme que me quedaba poco. Gracias, Mónica, por ayudarme con el poder antioxidante.

A los colegas del almuerzo: Antonio, Nacho y Juan Ramón. Por esas comidas tan *instructivas*, que me hacían olvidar los quebraderos de cabeza de la tesis.

A Enrique, a mis padres, a mí tía y a mi abuela, por apoyarme siempre, por confiar en que terminaría la tesis algún día. Gracias Enrique (dáselas también a tus padres) por estar siempre a mi lado y creer en mí. A todos, por soportar mi estrés y mis agobios.

A mis amig@s (Anabel, Chiqui, Loly, Nuria, Juan José, etc.) por preguntarme siempre por esta tesis, por preocuparse por mí.

A Enrique

ÍNDICE

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	Pág. 23
CAPÍTULO I: ANTECEDENTES	27
1. ELABORACIÓN DEL BRANDY DE JEREZ	29
1.1. DESTILACIÓN DEL VINO PARA LA OBTENCIÓN DE AGUARDIENTE.....	29
1.2. ENVEJECIMIENTO DEL BRANDY DE JEREZ.....	33
1.2.1. Sistema de Soleras y Criaderas.....	34
1.3. EL CONSEJO REGULADOR.....	36
1.4. MACERACIONES Y EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS.....	38
1.5. EL COLORANTE CARAMELO.....	39
2. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SOCIAL DEL BRANDY DE JEREZ	42
3. PARÁMETROS DE CALIDAD EN DESTILADOS ENVEJECIDOS EN MADERA	45
3.1. AZÚCARES.....	46
3.2. COMPUESTOS DEL AROMA.....	49
4. ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE CALIDAD EN ALIMENTOS Y BEBIDAS	56
4.1. ANÁLISIS DE AZÚCARES.....	56
4.1.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC ó CLAE).....	57
4.1.1.1. Preparación de muestra.....	57
4.1.1.2. Principios de la separación.....	58
4.1.1.3. Detectores.....	60
4.1.2. Aplicaciones de la determinación de azúcares.....	61
4.1.3. Cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia (HPAEC) con detección amperométrica de pulsos (PAD).....	63
4.1.3.1. Preparación de muestra.....	64
4.1.3.2. Principios de la separación por Cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución (HPAEC).....	65
4.1.3.3. Detección amperométrica de pulsos (PAD).....	69
4.1.3.4. Aplicaciones de la determinación de azúcares por este método.....	75
4.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN EN EL INFRARROJO.....	78
4.2.1. Introducción.....	78
4.2.2. Preparación de muestra.....	79
4.2.3. Instrumentación.....	80
4.2.4. Tratamiento de los datos.....	82
4.2.5. Aplicaciones.....	84

4.3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES.....	87
4.3.1. Introducción.....	87
4.3.2. Preparación de muestra.....	88
4.3.3. Instrumentación.....	93
4.3.4. Sistemas de detección.....	95
4.3.5. Aplicaciones.....	97
4.4. MEDIDA DEL PODER ANTIOXIDANTE.....	106
4.4.1. Introducción.....	106
4.4.2. Métodos para medir la actividad antioxidante.....	107
4.4.3. Aplicaciones.....	112
5. TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS.....	115
5.1. PRETRATAMIENTO DE LOS DATOS.....	115
5.1.1. Suavizado.....	115
5.1.2. Derivada.....	115
5.1.3. Análisis de Componentes Principales.....	116
5.1.4. Transformada de Fourier.....	118
5.2. ANÁLISIS CLASIFICATORIO.....	121
5.2.1. Análisis Lineal Discriminante.....	121
5.2.2. Validación de un modelo de clasificación.....	122
5.3. REGRESIÓN.....	123
5.3.1. Regresión Lineal Multivariante.....	123
5.3.2. Regresión de Componentes Principales.....	124
5.3.3. Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales.....	125
5.3.4. Detección de datos discrepantes en regresión.....	127
5.3.5. Validación de un modelo de regresión.....	127
5.4. REDES NEURONALES ARTIFICIALES.....	129
6. BIBLIOGRAFÍA.....	136

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS	161
1. DISOLUCIONES DE PATRONES Y REACTIVOS GENERALES	163
2. ANÁLISIS DE AZÚCARES	163
2.1. REACTIVOS Y SUSTANCIAS PATRONES.....	163
2.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	164
2.3. ANÁLISIS DE AZÚCARES MEDIANTE HPLC-RI.....	165
2.3.1. Instrumentación.....	165
2.3.2. Preparación de los eluyentes.....	166
2.3.3. Condiciones de separación y detección.....	166
2.4. ANÁLISIS DE AZÚCARES MEDIANTE HPAEC-PAD.....	167
2.4.1. Instrumentación.....	167
2.4.2. Preparación de los eluyentes.....	168
2.4.3. Condiciones de separación y detección.....	168
3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES MEDIANTE GC-MS	171
3.1. REACTIVOS Y SUSTANCIAS PATRONES.....	171
3.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	172
3.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO.....	173
4. OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS INFRARROJOS	175
4.1. INSTRUMENTACIÓN.....	175
5. MEDIDA DEL PODER ANTIOXIDANTE	176
5.1. REACTIVOS Y SUSTANCIAS PATRONES.....	176
5.2. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS.....	176
5.3. INSTRUMENTACIÓN.....	177
5.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.....	179
6. MUESTREO	180
6.1. SISTEMA PILOTO DE SOLERAS Y CRIADERAS.....	180
6.2. <i>BRANDIES DE JEREZ</i> COMERCIALES.....	186
6.3. DESTILADOS ENVEJECIDOS DE DISTINTO ORIGEN.....	187
6.4. COLORANTES CARAMELO.....	187
6.5. MACERADOS E INFUSIONES AROMÁTICAS.....	187
6.6. VINOS DULCES.....	187
7. PROGRAMAS INFORMÁTICOS	188
8. BIBLIOGRAFÍA	189

CAPÍTULO III: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	191
1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO HPLC-RI PARA EL ANÁLISIS DE AZÚCARES	193
1.1. ANÁLISIS DE DISOLUCIONES DE PATRONES	193
1.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA SEPARACIÓN	193
1.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA DETECCIÓN	197
1.4. CONDICIONES FINALES	198
1.5. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE BRANDY	199
2. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES MINORITARIOS EN BRANDIES DEL SISTEMA PILOTO MEDIANTE HPAEC-PAD	201
2.1. IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN BRANDY	201
2.2. MANOSA Y XILOSA	203
2.3. REPETIBILIDAD	205
2.4. CARACTERIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN	206
2.5. ESTANDARIZACIÓN DE LA SEÑAL (CALIBRACIÓN)	207
2.6. EVOLUCIÓN DE LOS AZÚCARES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO	209
2.7. CLASIFICACIÓN DE LOS BRANDIES SEGÚN EL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO	219
2.8. PREDICCIÓN DEL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO	225
3. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES MAYORITARIOS EN BRANDIES DE JEREZ MEDIANTE HPLC-RI	229
3.1. IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN BRANDIES DE JEREZ COMERCIALES	229
3.2. REPETIBILIDAD	230
3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN	231
3.4. ESTANDARIZACIÓN DE LA SEÑAL (CALIBRACIÓN)	231
3.5. ANÁLISIS DE AZÚCARES MAYORITARIOS EN BRANDIES DE JEREZ COMERCIALES...	232
3.6. ANÁLISIS DE AZÚCARES MAYORITARIOS EN DESTILADOS ENVEJECIDOS DE DISTINTO ORIGEN	235
4. ANÁLISIS DE EXTRACTOS, MACERACIONES Y COLORANTE CARAMELO MEDIANTE HPLC-RI Y HPAEC-PAD	239
4.1. IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN EXTRACTOS, MACERACIONES Y CARAMELOS...	239
4.2. PERFIL CUANTITATIVO DE AZÚCARES EN EXTRACTOS, MACERACIONES Y CARAMELOS	243

5. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES MEDIANTE GC-MS	248
5.1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN BRANDY	248
5.2. REPETIBILIDAD	253
5.3. CARACTERIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN	254
5.4. ESTANDARIZACIÓN DE LA SEÑAL (CALIBRACIÓN)	255
5.5. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN BRANDIES DEL ENSAYO EXPERIMENTAL DE ENVEJECIMIENTO	256
5.6. CLASIFICACIÓN DE LOS BRANDIES DEL ENSAYO DE ENVEJECIMIENTO	260
5.7. PREDICCIÓN DEL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO	261
5.8. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN <i>BRANDY DE JEREZ</i> COMERCIALES	265
5.9. CLASIFICACIÓN DE LOS <i>BRANDY DE JEREZ</i> COMERCIALES	267
6. PODER ANTIOXIDANTE	270
6.1. MEDIDA DEL PODER ANTIOXIDANTE	270
6.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA SEÑAL (CALIBRACIÓN)	270
6.3. REPETIBILIDAD	271
6.4. PODER ANTIOXIDANTE EN BRANDIES DEL ENSAYO EXPERIMENTAL DE ENVEJECIMIENTO	271
6.5. PODER ANTIOXIDANTE EN <i>BRANDIES DE JEREZ</i> COMERCIALES	273
6.6. PODER ANTIOXIDANTE EN EXTRACTOS AROMÁTICOS, MACERACIONES Y COLORANTE CARAMELO	276
6.7. PODER ANTIOXIDANTE EN DESTILADOS ENVEJECIDOS DE DISTINTO ORIGEN	278
7. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA	280
7.1. INTRODUCCIÓN	280
7.2. CLASIFICACIÓN DE LOS BRANDIES	281
7.3. REDUCCIÓN DE DIMENSIONES	282
7.4. CLASIFICACIÓN DE LOS BRANDIES MEDIANTE PCA-LDA	283
7.5. CLASIFICACIÓN DE LOS BRANDIES MEDIANTE FT-ANN	288
7.6. PREDICCIÓN DEL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO	291
7.7. REDUCCIÓN DE DIMENSIONES	291
7.8. PREDICCIÓN DEL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO	292
8. TRATAMIENTO CONJUNTO DE DATOS	296
8.1. INTRODUCCIÓN	296
8.2. DIFERENCIACIÓN DE LOS BRANDIES DEL ENSAYO DE ENVEJECIMIENTO	296
8.3. PREDICCIÓN DEL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO	300
8.4. DIFERENCIACIÓN DE BRANDIES DE JEREZ COMERCIALES	302
9. BIBLIOGRAFÍA	308
CAPÍTULO IV: CONCLUSIONES	311

JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

El *Brandy de Jerez* constituye la bebida espirituosa de mayor producción y exportación del país. Su calidad y tipicidad juegan un papel importante en la aceptación de la que está siendo objeto, pero al mismo tiempo es la causa de que se encuentre con algunos problemas, sobre todo en mercados internacionales, que exigen una cierta normalización de los productos, como criterio de calidad y adecuada elaboración. Dado que el *Brandy de Jerez* tiene que competir en los mercados con productos de características similares, como son los brandies de otras zonas, los cognacs, armagnacs, whiskies, etc., es necesario caracterizarlo analíticamente, para así contar con parámetros objetivos que sirvan para defender su tipicidad en las comisiones internacionales reguladoras de las bebidas espirituosas.

La composición del *Brandy de Jerez* va a venir dada por su forma de elaboración y especialmente por su sistema de envejecimiento dinámico, por soleras y criaderas, así como por las prácticas de adición de extractos y caramelo autorizados. Por tanto, son múltiples los parámetros que pueden participar en la caracterización y tipificación de los *Brandies de Jerez*.

En este contexto, y para dar respuesta a las necesidades existentes, fue aprobado el proyecto de investigación titulado “Optimización de los procesos de elaboración con vistas a la obtención de un *Brandy de Jerez* de calidad” (Plan Nacional I+D ref. AGL2001-3737). El objetivo final de este proyecto, que se desarrolló en colaboración con el Consejo Regulador de la Denominación Específica *Brandy de Jerez*, es realizar una caracterización global del *Brandy de Jerez* en base a su composición (compuestos polifenólicos, ácidos orgánicos, hidratos de carbono, compuestos volátiles, etc.) y evaluar, a partir de esta caracterización, las prácticas realizadas durante la elaboración del mismo. Este trabajo de investigación forma parte de dicho proyecto, como una parte de la caracterización global del *Brandy de Jerez* y de su particular sistema de elaboración y envejecimiento.

El objetivo particular del presente trabajo de investigación es la determinación de varios parámetros del *Brandy de Jerez*: la composición en azúcares, compuestos volátiles, el poder antioxidante y el espectro infrarrojo y el estudio de su relación con la vejez. A partir de los resultados obtenidos, se evaluará la capacidad de estos parámetros como indicadores alternativos de la calidad y el envejecimiento del brandy jerezano.

Para abordar la caracterización del *Brandy de Jerez* en base a los parámetros descritos, se ha seguido el plan de trabajo descrito a continuación:

1. Puesta a punto de los métodos y determinación de azúcares en brandies procedentes de un ensayo de envejecimiento y *Brandies de Jerez* comerciales, utilizándose para ello la cromatografía de intercambio aniónico de elevada resolución acoplada a la detección amperométrica de pulsos y la cromatografía de adsorción en fase normal con detección por índice de refracción.
2. Determinación del perfil aromático de *Brandies de Jerez* comerciales y del ensayo de envejecimiento. Esto se realizará mediante cromatografía de gases con detector de espectrometría de masas.
3. Medida del poder antioxidante de los brandies de *Brandies de Jerez* comerciales y del ensayo de envejecimiento. Se utilizará un dispositivo desarrollado y validado para tal fin en el grupo de investigación.
4. Obtención del espectro infrarrojo de *Brandy de Jerez* comerciales y del ensayo de envejecimiento. Los espectros infrarrojos se registraron mediante un espectrómetro automatizado.
5. De forma posterior a la determinación de estos parámetros, se estudió su relación con la edad del brandy (vejez y/o tiempo medio de permanencia del brandy en el sistema de envejecimiento), que se pondría de manifiesto también en la capacidad para la diferenciación entre las categorías comerciales del *Brandy de Jerez* (Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva), así como entre las escalas de envejecimiento (Solera, Primera Criadera, Segunda Criadera y Tercera Criadera). A su vez, se realizó una caracterización del envejecimiento del *Brandy de Jerez* en función de dichos parámetros, con el objetivo de encontrar características diferenciadoras frente a otros destilados de distinto origen.
6. Finalmente, se evaluó la capacidad de cada uno de estos parámetros para evaluar la calidad del *Brandy de Jerez*, así como sus aplicaciones potenciales en el control de calidad y el análisis de rutina durante la elaboración del *Brandy de Jerez*.

CAPÍTULO I: ANTECEDENTES

1. ELABORACIÓN DEL BRANDY DE JEREZ

Bibliografía empleada para la redacción de este epígrafe:

*Fernández de Bobadilla, V*¹.

*Rankine, B*².

*Flanzy, C.*³

1.1. DESTILACIÓN DEL VINO PARA LA OBTENCIÓN DE AGUARDIENTE

El Brandy de Jerez es elaborado mediante el envejecimiento en barrica de aguardientes y destilados de vino. Los aguardientes de vino aptos para la elaboración del “Brandy de Jerez” deberán obtenerse exclusivamente por destilación de vinos sanos y conservar las características organolépticas y componentes volátiles propios del vino del que proceden. La destilación se realiza en alambiques o alquitaras, que son básicamente de dos tipos: de vapor o de fuego directo⁴. En la práctica, se denominan alquitaras a los de fuego directo y alambiques a los de vapor, que son los utilizados para obtener el aguardiente de vino que más tarde se transformará en brandy.

En general, el proceso de destilación consiste en calentar, por cualquier procedimiento, en un recipiente adecuado, un líquido (el vino que se quiere destilar) hasta que sus componentes más volátiles pasen a la fase vapor y, a continuación, enfriar el vapor para recuperar dichos componentes en estado líquido por medio de la condensación. El vino de partida es, básicamente, una mezcla de etanol y agua, por lo que la destilación tendrá como resultado el enriquecimiento de la mezcla en el componente más volátil, es decir, el etanol. Esto es debido a que los puntos de ebullición del agua y el etanol (100 °C y 78,5 °C, respectivamente) sólo difieren ligeramente, por lo que no se puede conseguir la separación total en una destilación individual. La graduación del destilado que se obtiene será directamente proporcional al calor aplicado y al tiempo empleado.

Las alquitaras (también denominadas alambiques de *Charentais*) se emplean exclusivamente para la obtención de holandas (*figura 1*). El metal utilizado es el cobre, que presenta múltiples ventajas ya que es muy maleable, buen conductor del calor, resistente a la corrosión, y juega un papel de catalizador para ciertas reacciones químicas y de complejación de moléculas poco agradables a nivel organoléptico (tioles, mercaptanos, ácidos grasos). El combustible que se emplea en la destilación es leña de encina. La combinación del cobre con este tipo de leña contribuye de forma sutil a la gran calidad de las holandas que se obtienen.

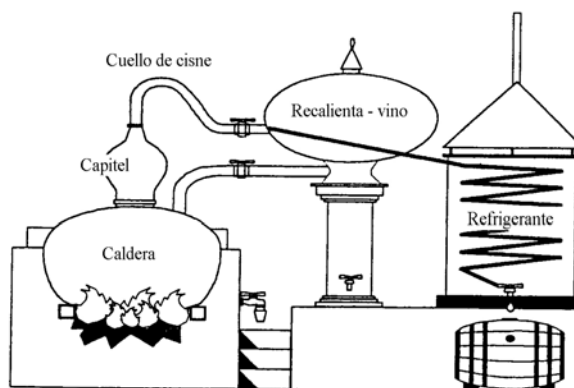


Figura 1: Alambique Charentais tradicional de calentamiento de vino.

Se realiza una destilación simple del vino sin sus lías (la cantidad de lías aportadas al vino en la alquitara puede modificar sensiblemente el perfil aromático de los aguardientes obtenidos). Los vinos empleados son calificados siempre como vinos de mesa, en un 90% de la variedad Airén. El vino se deposita en una caldera, sobre la que se aplica un fuego directo de leña como fuente de calor para hacerlo hervir. Algunos vapores condensan en el Capitel y Cuello de cisne para retornar a la caldera, mientras que el resto es conducido a un serpentín refrigerado por agua fría, donde se produce la condensación y recogida del destilado. No todo el producto destilado es aprovechable para la elaboración del Brandy de Jerez: las primeras fracciones obtenidas al comenzar la destilación, llamadas “cabezas” y las últimas, llamadas “colas”, son separadas, utilizándose sólo la parte central llamada “corazón”, con una graduación de 65-70°.

El Consejo Regulador reconoce los siguientes tipos de aguardientes de vino según su contenido alcohólico:

- Aguardiente de vino de baja graduación denominado tradicionalmente “Holandas”, si su graduación alcohólica no es superior al 70 % (v/v).
- Aguardiente de vino con graduación alcohólica comprendida entre 70 y 86 % (v/v).
- Destilado de vino cuya graduación alcohólica está comprendida entre 86 y 94.8 % (v/v).

En todo caso, los aguardientes de vino deberán representar más del 50 por 100 en grado alcohólico del producto acabado.

Cuando salen del dispositivo de destilación, los aguardientes y holandas están formados principalmente por una mezcla de alcohol etílico y agua, que tiene en disolución ciertos componentes procedentes del vino (sustancias volátiles), que han sido arrastradas en la destilación y aportan a los destilados su peculiar gusto y aroma. Las cualidades analíticas y organolépticas de los tres tipos de aguardientes de vino descritos anteriormente, tienen entre sí notables diferencias: las holandas son más ricas en sustancias volátiles procedentes del vino, desprenden asimismo olores más profundos y tienen más aroma y sabor. Los componentes volátiles van desapareciendo al ir aumentando el grado alcohólico. De esta forma, podemos establecer que en las holandas oscilarán entre los 250 y 500 mg por cada 100 cL de alcohol absoluto, en los aguardientes de media graduación entre 180 y 250 mg, y los alcoholes destilados contienen entre 120 y 180 mg. Un análisis de cien muestras de Brandy de Jerez dio una media de 370 mg de componentes volátiles por cada 100 cL de alcohol absoluto, contenido muy superior al mínimo exigido en ciertos países para brandies de importación. En la Comunidad Económica Europea el límite mínimo establecido es de 125 mg por cada 100 cL de alcohol absoluto.

Las holandas o “bajos grados” constituyen la base de la elaboración del Brandy, pues, debido a que no han sufrido las rectificaciones a las que se someten los aguardientes de media y alta graduación, son más ricos en productos esenciales. La utilización de holandas para la elaboración de brandy puede hacerse como único aguardiente o combinándolas con otros aguardientes de vino (operación denominada cabeceo). La combinación que se efectúe, estará ligada al tipo de Brandy de que se trate y deberá tener en cuenta la riqueza en sustancias volátiles de cada uno, a fin de obtener un resultado de contenido armónico y equilibrado. No obstante, la calidad del brandy obtenido aumenta cuanto mayor es la calidad de las holandas empleadas. Es necesario resaltar la vital importancia que tiene la selección de holandas en la obtención de un Brandy de Jerez de calidad, así como que éstas procedan de vinos sanos y rigurosamente seleccionados.

Los alambiques de columna (*figura 2*) se utilizan para obtener aguardientes de alta y media graduación (entre 70 y 94,8%). El grado técnico y la precisión alcanzados en estas modernas instalaciones son muy elevados, aunque para las holandas de alta calidad se siguen prefiriendo las alquitaras. En el alambique de columna, el calor es aportado directamente al líquido a destilar mediante mezcla con vapor de agua producido en una caldera separada, a diferencia del calentamiento a fuego directo que se realiza en la alquitara.

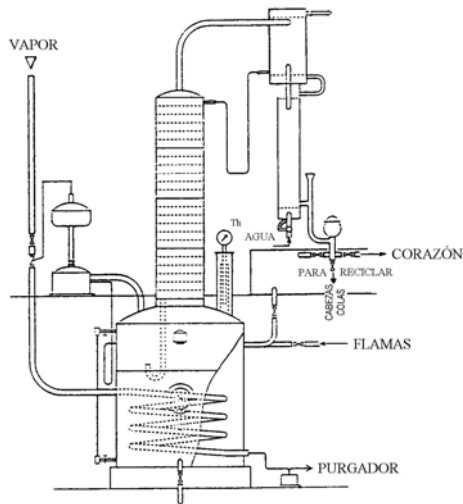


Figura 2: Alambique de columna.

El alambique de columna consta de dos partes, donde se llevan a cabo dos procesos distintos: separación (columna de platos) y rectificación. El vino atraviesa el rectificador en un serpentín, calentándose conforme pasa antes de ser llevado a lo alto del separador. Allí, un juego de platos y de aletas lo fracciona y lo hace descender lentamente hasta la parte inferior, donde es llevado a la temperatura de ebullición en contacto con el vapor de agua. Éste tiene como misión arrastrar los vapores de los alcoholes producidos que remontan así a través de las aletas antes de ser conducidos a la parte inferior del rectificador, donde la temperatura elevada en la parte inferior disminuye progresivamente a medida que va subiendo. Las fracciones más ligeras de las cabezas se escapan por la parte superior. Son igualmente eliminadas las colas que son ricas en elementos no alcohólicos. Sólo son recuperados de forma provechosa para la producción de aguardiente los vapores recogidos a un nivel más o menos elevado del rectificador según el grado alcohólico deseado.

1.2. ENVEJECIMIENTO DEL BRANDY DE JEREZ

El envejecimiento del Brandy de Jerez se realiza en barricas de roble americano (*Quercus alba*, junto con otras especies), que se denominan “botas” en la zona de Jerez. Su capacidad está comprendida entre 250 y 600 litros. El roble americano procede, principalmente, de Nueva Orleans (Luisiana) y Nueva York. Se han hecho experiencias con roble español pero, debido a su mayor peso, al sabor diferente que comunicaba, y a su excesiva porosidad (con las consiguientes pérdidas de líquido), su utilización ha sido desestimada. La porosidad del roble Americano es la apropiada para permitir el contacto del brandy con el oxígeno del aire, facilitando la oxidación que favorece el envejecimiento.

La influencia de la madera en la elaboración del brandy jerezano es determinante (como veremos más adelante), pues ésta le cede diversas sustancias que modifican y contribuyen a su gusto, aroma y sabor. Es importante la capacidad de cesión de la madera, que depende del tamaño y la edad de la barrica. A menor tamaño, la superficie de madera en contacto con el líquido es mayor, por lo que no conviene utilizar vasijas pequeñas, ya que la influencia de la madera sería excesiva. La experiencia ha determinado el empleo de botas de 500 a 600 L como la capacidad más idónea para el envejecimiento del brandy, pues en ella se da el equilibrio ideal entre superficie de madera y volumen de contenido. El Reglamento del Consejo Regulador de la Denominación Específica Brandy de Jerez permite vasijas de capacidad inferior a 1000 L.

El reglamento establece que debe tratarse de botas envinadas durante al menos tres años, es decir, que hayan contenido durante ese tiempo vino de Jerez: Fino, Oloroso, Amontillado, Pedro Ximénez, etc. Estas botas contribuyen significativamente a dotar al Brandy de Jerez de matices diferentes dependiendo del tipo de botas empleadas. De esta forma, las botas de Fino permiten la obtención de brandies más pálidos que los procedentes de vasijas que hayan contenido Amontillados u Olorosos. El Brandy de Jerez resultante del envejecimiento en botas que hayan contenido Pedro Ximénez, será el más abocado y oscuro. El envinado va a marcar la diferencia fundamental respecto a otros brandies fuera del contexto de la Denominación Específica “Brandy de Jerez”.

1.2.1. Sistema de Soleras y Criaderas

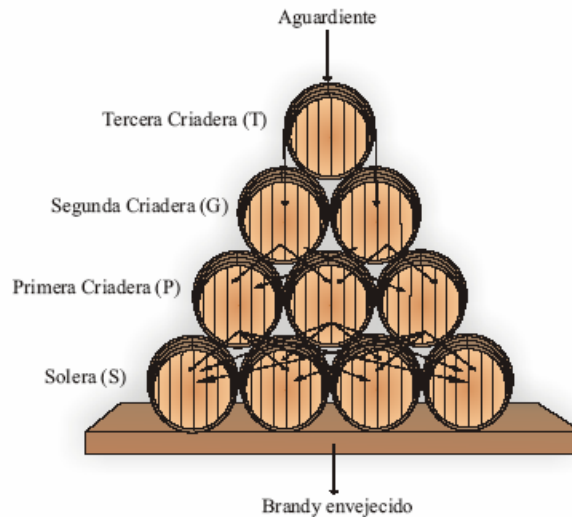


Figura 3: Sistema de Soleras y Criaderas.

La adopción, para el Brandy de Jerez, de este sistema de envejecimiento tradicional jerezano, usado para la crianza y envejecimiento de los vinos de Jerez, puede calificarse de crucial y es, sin duda, uno de los factores diferenciadores que imprime una singularidad característica al Brandy de Jerez (*figura 3*).

Se trata de un procedimiento que podemos calificar de “dinámico”, a diferencia del envejecimiento “estático” por Añadas. En el sistema de Añadas (*figura 4*), el aguardiente permanece en la misma bota durante todo el periodo de envejecimiento, por lo que no se realizan trasiegos y sólo se mezcla con aguardientes procedentes de distintos niveles de envejecimiento con carácter previo a su comercialización. El método de Soleras y Criaderas, sin embargo, consiste en un almacenamiento del aguardiente en botas que han sido divididas en grupos, llamados “escalas”, según la vejez del brandy que contienen. Cada escala está formada, aproximadamente, por el mismo número de botas. La escala que contiene el brandy de mayor vejez se denomina “Solera” (situada sobre el suelo), seguida, en orden de vejez, por la Primera, Segunda y

Tercera Criadera. A la Solera, Primera, Segunda y Tercera Criadera también se las denomina, respectivamente, escala primera, segunda, tercera y cuarta.

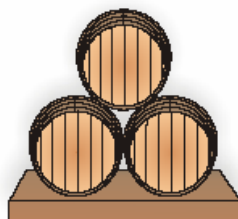


Figura 4: Sistema de Añadas.

De la Solera se extrae una pequeña cantidad (operación llamada “Saca”), que debe ser la misma en cada una de las botas que la forman, para su embotellado y distribución. El vacío ocasionado se repone con una porción equivalente de brandy procedente de la primera Criadera (operación llamada “Rocío”), siguiéndose el mismo procedimiento con la Primera y Segunda Criadera, que se rellenan con el brandy procedente de la Segunda y Tercera Criadera, respectivamente. La Tercera Criadera, a su vez, se rellena con los aguardientes de vino obtenidos en la destilación. A este procedimiento de trasiego de aguardientes entre escalas, que se resume en la *figura 3*, se le denomina “correr escalas”. Las operaciones de Saca y Rocío se realizan periódicamente, es decir, a intervalos de tiempo constantes. Una vez realizada la Saca, y antes del Rocío, se mezcla el brandy extraído de cada una de las botas de la misma escala, con el objetivo de homogeneizar el contenido de las botas.

El sistema de Soleras y Criaderas permite obtener un brandy uniforme en sabor, aroma y color, con las mismas características organolépticas, ya que al ser una pequeña parte la que se va reponiendo sucesivamente, esta porción adquiere las características de la mayor masa de brandy con que se encuentra. Este procedimiento favorece una mayor y más rápida oxidación del Brandy de Jerez, al airearse en los continuos trasiegos.

Después del envejecimiento en el sistema de Soleras y Criaderas, se disminuye el grado alcohólico del aguardiente mediante dilución con agua pura hasta situar el producto final a 38-40 %. A su vez, se realizan mezclas entre aguardientes

pertenecientes a distintos niveles de envejecimiento y/o adiciones de distintos extractos, maceraciones, caramelos, etc. (los productos autorizados se detallan en el siguiente apartado), con el objetivo de mantener la uniformidad del producto frente al consumidor. Al conjunto de estas operaciones se le denomina “cabeceo”. Finalmente, el brandy se someterá al proceso de estabilización físico-química, que le proporcionará la consistencia adecuada antes de ser embotellado.

Según las características de los aguardientes y destilados de vino y del proceso de elaboración y envejecimiento, el Consejo Regulador distingue tres tipos de brandies de Jerez:

- Brandy de Jerez Solera: es el brandy que ha sido envejecido en bota más de 6 meses. Su contenido en sustancias volátiles, es decir, la suma de ácidos volátiles, aldehídos, ésteres y alcoholes superiores deberá ser superior a 200 mg/100 mL de alcohol al 100 % en volumen.
- Brandy de Jerez Solera Reserva: es el brandy que ha sido envejecido en bota más de un año. Su contenido en sustancias volátiles deberá ser superior a 250 mg/100 mL de alcohol al 100 % en volumen.
- Brandy de Jerez Solera Gran Reserva: es el brandy que ha sido envejecido en bota más de 3 años. Su contenido en sustancias volátiles deberá ser superior a 300 mg/100 mL de alcohol al 100 % en volumen.

1.3. EL CONSEJO REGULADOR

La vieja aspiración de las bodegas de la zona de Jerez de establecer lo que podríamos llamar un marco técnico-jurídico en el que pudieran encuadrarse, con el doble fin de proteger las cualidades intrínsecas y peculiares del Brandy de Jerez por una parte y proporcionar una información exacta al consumidor por otra, fue finalmente satisfecha con la creación de un Consejo Regulador. En efecto, con fecha de 31 de julio de 1987, quedó aprobado por la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, el Reglamento de la Denominación Específica Brandy de Jerez y de su Consejo Regulador⁵, con lo que al fin todos: bodegueros, comerciantes y consumidores, iban a saber con toda claridad qué producto elaboraban, qué producto vendían y qué producto consumían.

El Consejo Regulador es el Organismo encargado de velar por el cumplimiento del Reglamento de la Denominación Específica Brandy de Jerez. El Consejo Regulador

es un Organismo desconcentrado de la Administración Española y dependiente de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía. En el Consejo Regulador están representadas las Bodegas de elaboración, Técnicos independientes y representantes de la propia Administración. La misión del Consejo Regulador es doble: de una parte la vigilancia del cumplimiento del Reglamento, y de otra, el fomento y control de los brandies amparados por el propio Consejo.

A lo largo de este capítulo se ha hecho referencia a las exigencias y características del Brandy de Jerez, de acuerdo con la reglamentación existente^{5,6,7,8,9,10,11,12}. Las más importantes, en lo referente al tema que se trata, se resumen a continuación:

- La zona de elaboración y envejecimiento del Brandy de Jerez está constituida, exclusivamente, por los términos municipales de Jerez de la Frontera, El Puerto de Santa María y Sanlúcar de Barrameda.
- Los aguardientes de vino han de ser obtenidos exclusivamente por destilación de vinos sanos. Asimismo, deberán conservar los productos secundarios propios del vino, y cumplir las especificaciones establecidas al respecto por el Consejo Regulador.
- El sistema de elaboración y envejecimiento ha de ser el tradicional de Criaderas y Soleras. El reglamento también recoge el sistema de Añadas, que normalmente precede al de Criaderas y Soleras en los brandies de calidad superior. También está permitido el “cabeceo” o combinación de varios brandies procedentes de distintas soleras de una misma bodega.
- En todos los casos, han de emplearse siempre botas de roble con una capacidad inferior a 1000 litros, previamente envinadas con vino de Jerez.
- Todos los brandies amparados por la Denominación Específica “Brandy de Jerez” deberán tener una graduación alcohólica real comprendida entre los 36° y los 45° y deberán presentar las cualidades organolépticas propias de los mismos, en cuanto a color, aroma y sabor.
- La legislación recoge una práctica tradicional como es la adición de maceraciones aromáticas de frutas para dar tipicidad y carácter diferenciador a cada producto. Se emplean infusiones y extractos hidroalcohólicos obtenidos con uva pasa, ciruela pasa, virutas de madera de roble, pericarpio de almendra, vainas de vainilla, cortezas de nueces verdes y lías de vino producidas en la fermentación del mosto. Asimismo, la legislación recoge la

edulcoración con azúcares naturales (sacarosa, glucosa y vino dulce natural) y el ajuste del color final del producto con colorante caramelo (de sacarosa, de glucosa o de mosto de uva). Otro componente fundamental es el agua, que será aproximadamente el 50 % del producto: la legislación autoriza el empleo de agua destilada, desionizada o desmineralizada para rebajar el grado alcohólico.

1.4. MACERACIONES Y EXTRACTOS HIDROALCOHÓLICOS

El empleo de maceraciones y extractos hidroalcohólicos en brandy está autorizado en España⁷ desde el año 1977, y su elaboración se realiza conforme a lo dispuesto en las directivas de la Unión Europea¹³ y su transposición a las disposiciones nacionales¹⁴. Las maceraciones y extractos utilizados en brandy son elaborados a partir de pericarpios de almendra, ciruelas, uvas pasas, cortezas de nueces verdes, vainas de vainilla y virutas de roble. Los procedimientos descritos para la elaboración de maceraciones y extractos incluyen extracciones sólido-líquido, como la destilación o extracción por disolventes, que se realizan sobre la materia prima en estado natural o transformada mediante procesos de secado, tostado y fermentación^{13,14}. Según los datos proporcionados por el Consejo Regulador de la Denominación Específica Brandy de Jerez, el empleo de extractos y maceraciones en la elaboración de brandies comerciales no supera, en general, el 3 %.

1.5. EL COLORANTE CAMELO

Bibliografía empleada para la redacción de este epígrafe:

*Myers, D.V. et al.*¹⁵.

*Light, B.H. et al.*¹⁶.

*Benhura, M.A.N. et al.*¹⁷.

*Ratsimba, V. et al.*¹⁸.

El caramelo* ha sido utilizado durante milenios para aportar color y aroma a bebidas y alimentos. Originariamente, el caramelo era elaborado mediante el simple calentamiento de azúcares en un recipiente abierto. A medida que se extendió su uso, se introdujeron modificaciones en el proceso de elaboración, con el objetivo de obtener productos con las propiedades funcionales requeridas para aplicaciones específicas. Esto se denomina *compatibilidad* y está relacionado con la estabilidad del colorante caramelo en un determinado alimento (ausencia de separación, floculación, enturbiamiento, precipitación, etc.). Estos efectos indeseables son el resultado de las interacciones coloidales de los componentes macromoleculares cargados del caramelo con determinados alimentos. Por tanto, la carga iónica neta de las macromoléculas del caramelo, al pH en el que es utilizado, es determinante de su compatibilidad.

En la *tabla 1* se clasifican los caramelos en cuatro clases distintas en función de las propiedades coloidales, o macromoleculares, de sus constituyentes. Estas propiedades vienen determinadas por los reactivos utilizados para promover la caramelización. Los usuarios especifican o seleccionan un caramelo particular, de los cuatro tipos, según la naturaleza del producto en el que vaya a ser usado y la intensidad de color deseada.

* Durante este capítulo, y con excepción de los epígrafes, nos referiremos al colorante caramelo como *caramelo*.

CARACTERÍSTICAS	TIPO DE CARAMELO			
	I	II	III	IV
Usos típicos	Bebidas destiladas, postres, mezclas picantes	Licores	Productos de panadería, cerveza, salsas	Bebidas no alcohólicas, comida de mascotas, sopas
Carga iónica neta en condiciones normales de uso	Negativa	Negativa	Positiva	Negativa
¿Se utilizaron compuestos de amonio?	No	No	Sí	Sí
¿Se utilizaron compuestos sulfurosos?	No	Sí	No	Sí

Tabla 1: Clasificación de los caramelos.

Manufactura y naturaleza química de los colorantes caramelos

La caramelización es un proceso de degradación de los carbohidratos que implica una serie de reacciones, consecutivas y competitivas, que se aceleran a altas temperaturas y son catalizadas por ácidos y bases. Las reacciones de caramelización incluyen cambios en el tamaño del anillo de los monosacáridos, ruptura y formación de enlaces glucosídicos, deshidratación, introducción de dobles enlaces y formación de anillos de anhídrido. En general, la formación del caramelo implica reacciones de condensación en las que se liberan moléculas de agua. Los caramelos son preparados a partir de azúcares, en presencia de ácidos, bases, sales, compuestos sulfúricos o materiales nitrogenados. Puede que sea necesario calentar los reactivos bajo presión para maximizar la formación de los compuestos coloreados deseados.

En general, el proceso de fabricación del caramelo comienza añadiendo la cantidad apropiada de carbohidrato en el recipiente de reacción a una temperatura de 50-70 °C. La temperatura del azúcar se aumenta hasta aproximadamente 100 °C, se añaden los reactivos y continúa el calentamiento hasta que se alcanza la temperatura deseada. El rango de presiones va de la presión atmosférica (en torno a 1 kg.cm⁻², en recipiente abierto) a 5,3 kg.cm⁻² (en recipiente cerrado). La caramelización es exotérmica y, una vez alcanzada la máxima temperatura, el proceso es controlado mediante calentamiento y enfriamiento del sistema. Cuando se alcanza la intensidad de

color deseada, el sistema es enfriado por distintos métodos, como la adición directa de agua. Después del enfriamiento (la temperatura del producto es de 80 °C, aproximadamente), el producto es filtrado y transferido a un depósito, donde se regula el pH mediante adición de ácidos o bases y agua, para cumplir las especificaciones de los usuarios.

A pesar de que glucosa y fructosa son las materias primas que caramelizan más fácilmente, también se utiliza azúcar de caña (sacarosa), lactosa, malta, hidrolizados de almidón (procedentes de trigo, maíz o tapioca), miel y melazas*. Muchos caramelos son preparados a partir de jarabe de maíz. Sin embargo, aunque los carbohidratos pueden variar, los caramelos funcionales sólo pueden ser preparados a partir de carbohidratos de elevado contenido en glucosa, ya que la caramelización se produce inicialmente a través de los monosacáridos. Para ello, se recurre a tratamientos como la hidrólisis ácida, que reduce las variaciones estructurales entre almidones de distinto origen vegetal. Cuando se utiliza sacarosa como materia prima para la obtención de caramelo, es invertida a glucosa y fructosa antes de la caramelización.

Las propiedades funcionales de los caramelos (como la intensidad de color, la estabilidad o las propiedades emulsionantes) vienen determinadas por la composición química que, a su vez, depende de los reactivos empleados en la preparación. El tipo de reactivo es un factor clave en la elaboración del caramelo, ya que determina la composición química del producto final. Resulta lógico entonces clasificar los caramelos en función de sus propiedades y de los reactivos usados en su preparación.

La proporción de reactivo y carbohidrato también afecta, de forma considerable, a la composición química. Si bien el tipo de reactivo determina los componentes presentes en el caramelo, su proporción controla en gran medida las cantidades de estos constituyentes en un determinado caramelo. En resumen, la composición química del caramelo está cualitativamente determinada por el tipo de reactivo y cuantitativamente gobernada por la concentración de dicho reactivo.

En la elaboración del brandy, el empleo de colorante caramelo (de sacarosa, glucosa o mosto de uva) está autorizado desde 1977 por la reglamentación nacional⁶, que después se ha extendido a otras bebidas espirituosas que requieran un envejecimiento en vasija^{19,20}. El colorante caramelo se utiliza en brandy con el objetivo de regular el color final para presentar al mercado un producto uniforme en cuanto al color. Por tanto, la adición de colorante caramelo constituye más un requisito comercial que una práctica tradicional.

* Melaza: líquido viscoso, de color pardo oscuro, que se obtiene como residuo en la fabricación de azúcar de caña o de remolacha.

2. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y SOCIAL DEL BRANDY DE JEREZ

El brandy es una de las grandes bebidas universales. Su consumo está altamente extendido por todo el mundo y son numerosos los países con tradición vitivinícola que elaboran brandy. El brandy tiene en España una gran tradición, ya que constituye uno de los principales elaboradores y consumidores mundiales. El 95% del brandy español procede del Marco de Jerez, único con una Denominación Específica. La importancia económica se pone de manifiesto en los siguientes puntos:

- El Brandy de Jerez es la principal bebida espirituosa de España, con un volumen de producción en torno a los 99 millones de botellas al año.
- El Brandy de Jerez es, con gran diferencia, la bebida espirituosa más exportada de España, con un volumen de más de 32 millones de botellas en el año 2001. Se exporta a más de 66 países de los cinco continentes (figura 5).

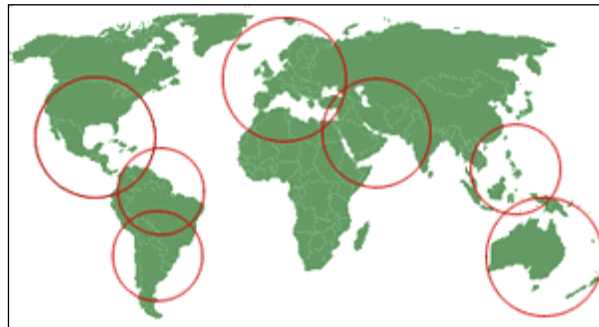


Figura 5: Países importadores de Brandy de Jerez: aproximadamente un 30 % de los países del mundo importan Brandy de Jerez.

- La producción anual de Brandy de Jerez requiere una entrada mínima anual al sistema de envejecimiento de unos 34 millones de litros absolutos de alcohol de vino. Este supone 220 millones de litros de vino o unos 350 millones de Kg de uvas. En términos de superficie, unas 75.000 hectáreas de viñedo están destinadas a este fin.

- El volumen de negocio del Brandy de Jerez superó, en el año 2001, los 70.000 millones de pesetas.

País/Zona	Botellas de 0,7 L
Filipinas	8.068.000
China	5.838.000
Alemania	2.846.000
México	6.838.000
Venezuela	1.233.000
Gran Bretaña	1.222.000
Italia	808.000
EE.UU.	611.000
Guinea ecuatorial	794.000
Eslovaquia	619.000
Z. Francas	1.026.000
Resto países	3.047.000
Total	32.448.000

Tabla 2: Cifras de exportación por países (año 2001).

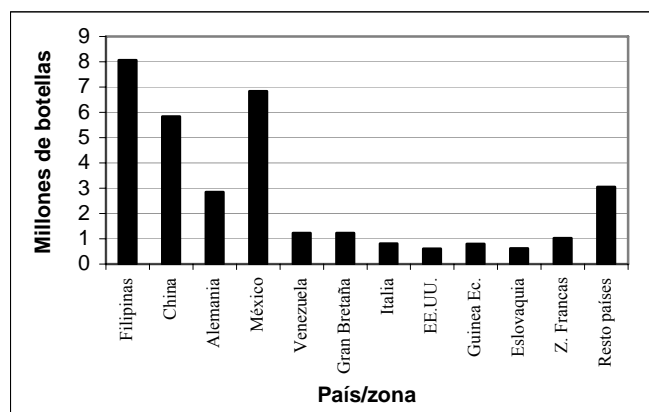


Figura 6: exportación del Brandy de Jerez por países durante el año 2001.

MERCADO NACIONAL	66.941.000
MERCADO EXTERIOR	32.448.000
Europa	6.547.000
América	9.550.000
África	1.840.000
Asia/Oceanía	13.485.000
Zonas Francas	1.026.000
Total	99.389.000

Tabla 3: Cifras de mercados en botellas de 0.7 L (año 2001):

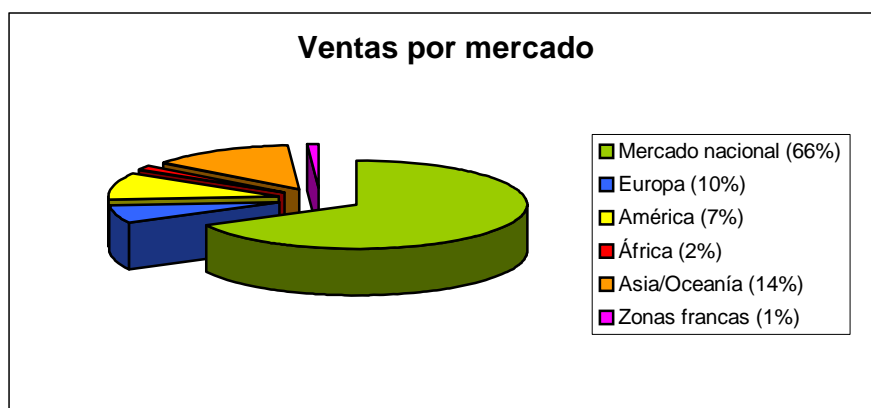


Figura 7: ventas por mercado en botellas (año 2001).

En cuanto al consumo, durante el año 2002 el consumo de Brandy de Jerez se incrementó en un 0,9 % en el mercado español y en más de un 15 % en los mercados exteriores.

La producción de Brandy de Jerez (Salidas de Bodega) alcanzó un total de 63.402.241 botellas durante el año 2002. De este total, el 50,1 % (31.777.951 botellas) tuvieron como destino el mercado nacional, mientras que el 49,9 % (31.624.290 botellas) fueron exportadas a sesenta y ocho países de los cinco continentes.

La producción del año 2002 se vio fuertemente afectada por el efecto distorsionador que supuso el incremento del 8 % en los Impuestos Especiales que gravan a las bebidas espirituosas, que entró en vigor el 1 de enero de 2002. En determinados mercados exteriores de relevancia para el Brandy de Jerez (México,

Puerto Rico,...) también hubo fuertes incrementos fiscales que afectaron a la producción durante el año 2002.

En efecto, ya en el año 2002 se advertía - en relación con la cifra de Salidas de Bodega del año 2001- que el crecimiento de un 31,4 % de las salidas respecto a las del año 2000 debía valorarse con prudencia, dado el indudable efecto distorsionador que había provocado en España la elevada subida del Impuesto Especial sobre el Alcohol y bebidas Derivadas con efecto 1 de enero del año 2002, así como las soportadas también en determinados mercados exteriores. La cifra de salidas en el año 2002 ha venido a corroborarlo, con una disminución de un 36,2 % en el volumen de salidas de Bodegas.

A esta caída ha contribuido no sólo el efecto fiscal antes mencionado, sino también, y muy significativamente, la desaceleración del consumo privado y la caída de los ingresos totales por turismo en el año 2002 (un 5,5 %) y, por supuesto también, los propios incrementos de precios derivados de la implantación del euro.

3. PARÁMETROS DE CALIDAD EN DESTILADOS ENVEJECIDOS EN MADERA

El envejecimiento en madera es uno de los factores más importantes que determinan la calidad de las bebidas destiladas. Una amplia gama de estas bebidas son envejecidas en barricas de roble, sobre todo brandies y whiskies pero también muchos rones y licores. A pesar de que probablemente en sus orígenes servía únicamente para el almacenamiento y transporte, el tiempo que el aguardiente pasa en las barricas es hoy en día un factor decisivo para el aroma y sabor finales del destilado. Durante el envejecimiento tienen lugar una serie de interacciones físicas y químicas entre la barrica, la atmósfera que lo rodea y el aguardiente, que modifican su aroma, sabor y composición. Esto cambios pueden estar causados por los siguientes fenómenos²¹ :

- Extracción directa de componentes de la madera.
- Descomposición de las macromoléculas de la madera y extracción de sus productos por el destilado.
- Reacciones entre los componentes de la madera y los del destilado de partida.
- Reacciones que implican únicamente a los compuesto extraídos de la madera.
- Reacciones que implican únicamente a los componentes del destilado.
- Evaporación de compuestos volátiles.

Entre las reacciones que se producen durante el envejecimiento, se pueden destacar la formación de acetales, esterificación e hidrólisis de ésteres. La extensión en la que se producen los cambios en la composición durante el envejecimiento depende de la composición inicial del destilado, que a su vez varía en función de la composición del vino de partida y del tipo de destilación realizada. También influyen el origen de la madera de roble, el secado y los tratamientos posteriores de la barrica durante la fabricación. El envejecimiento de los destilados en barricas produce cambios de composición adicionales debidos a las pérdidas de agua y alcohol mediante difusión a través de los poros de la barrica y su posterior evaporación en la atmósfera. La velocidad con la que se producen estas pérdidas por evaporación-difusión depende de la temperatura, tamaño de la barrica (relación superficie/volumen), grosor de las duelas, humedad relativa y peso molecular de los compuestos. Se han descrito pérdidas del 1 % al 7 % en volumen al año^{21,22}.

3.1. AZÚCARES

Una de las primeras referencias sobre la presencia de monosacáridos durante el proceso de envejecimiento se refiere a las variaciones en el contenido de azúcares y su migración desde las fibras de la madera hacia el brandy a temperaturas de 45-50°C y 70-75°C²³. Se menciona un aumento en los contenidos de galactosa, fructosa, xilosa, arabinosa y glucosa.

Se ha descrito un aumento en el contenido de azúcares de hasta 2000 mg L⁻¹ en brandies envejecidos durante 40 años (indicando valores de xilosa, arabinosa, glucosa y fructosa)²⁴, mientras que el coñac envejecido en barricas de roble durante 30 años²⁵ puede llegar a valores de 500 mg L⁻¹. De igual forma, se ha confirmado la presencia de arabinosa, glucosa, xilosa, ramnosa y fucosa en un brandy envejecido durante 6 meses en barricas de roble Limousin²⁶. El Whisky Bourbon envejecido 4 años en barricas tostadas presentó arabinosa (11,9 mg L⁻¹), glucosa (8,5 mg L⁻¹), xilosa (2,4 mg L⁻¹), fructosa (1,7 mg L⁻¹) y galactosa (0,5 mg L⁻¹)²⁷. El contenido en azúcares de varias bebidas espirituosas envejecidas durante 96 meses en barricas tostadas aumentó hasta 292 mg L⁻¹ y estuvo compuesto por arabinosa (35%), glucosa (38%), xilosa (12%), fructosa (9%), ramnosa (4%) y galactosa (3%)²⁸.

AZÚCARES DESCRITOS ANTERIORMENTE	MATRIZ^{referencias}
Arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa, fructosa	Brandy ²³
Arabinosa, glucosa, xilosa, fructosa	Brandy ²⁴
Arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa, fructosa, ramnosa, sacarosa	Brandy ²⁹
Arabinosa, ramnosa, galactosa, glucosa, xilosa, ribosa, fucosa	Brandy de sidra ³⁰
Arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa, manosa	Whisky de malta ^{31,32,33}
Arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa, fructosa	Whisky Bourbon ²⁷
Arabinosa, glucosa, xilosa, fructosa, ramnosa, galactosa	Bebidas espirituosas envejecidas ²⁸
Arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa, fructosa	Coñac ³⁴

Tabla 4: azúcares descritos con anterioridad en brandy y otros destilados.

El aumento observado en el nivel de azúcares del brandy durante el envejecimiento es atribuido a la hidrólisis ácida de la hemicelulosa de la madera, con la consiguiente liberación de azúcares^{21,22,25,26,33}. Esto se confirma debido al aumento observado en el nivel de azúcares del brandy cuando se añaden extractos de madera de roble durante el envejecimiento³⁵. La celulosa y la hemicelulosa (polisacáridos) son los principales constituyentes de la madera³⁶. La celulosa es un homopolímero formado por unidades de D-glucosa unidas por enlace glucosídico β -(1-4), mientras que la hemicelulosa es un heteroglicano que contiene diferentes tipos de monosacáridos neutros (pentosas y hexosas) y ácidos (ácidos urónicos) como elementos estructurales. La celulosa es inerte durante el envejecimiento, mientras que la hemicelulosa genera monosacáridos mediante hidrólisis ácida. La hidrólisis completa del roble americano (*Quercus alba*) reveló, como porcentaje de materia seca, un 55 % de carbohidratos totales: 36% glucosa, 15% xilosa, 2% galactosa, 1.3% arabinosa y 1,4% manosa³⁷.

* El porcentaje de materia seca de la madera es aproximadamente de 50% de celulosa, 20% de hemicelulosa y 30% de lignina. La celulosa se considera la estructura base de la madera, la hemicelulosa la matriz y la lignina el recubrimiento (aunque un 70% de la lignina está en las paredes celulares).

El contenido en azúcares procedentes de la madera puede ser elevado en bebidas espirituosas y representa una fracción importante de los sólidos extraídos²². La extracción durante 5 meses de virutas de roble americano con etanol al 62 % y a una temperatura de 20°C, proporcionó las siguientes concentraciones de azúcares (antes y después de la hidrólisis de los sólidos extraídos): glucosa (16 y 29 mg L⁻¹), arabinosa (6 y 14 mg L⁻¹), xilosa (4 y 6 mg L⁻¹), galactosa (1 y 5 mg L⁻¹), ramnosa (1 y 3 mg L⁻¹) y manosa (3 y 2 mg L⁻¹)³⁸. La comparación entre brandies envejecidos en barricas americanas (roble americano) y francesas (roble Limousin), reveló una proporción arabinosa:glucosa de 2:1 en los productos americanos y 1:1 en la mayoría de los franceses (tabla 5)³⁹.

Azúcar	Roble americano	Roble francés
Arabinosa	123	71
Glucosa	59	71
Xilosa	32	24
Fructosa	21	24
Ramnosa	17	12
Galactosa	12	6
Total	264	208

Tabla 5: Concentración media de azúcares (mg L⁻¹) en brandies envejecidos, de 4 a 8 años, en barricas de roble americano y francés.

En el análisis cuantitativo de monosacáridos en el whisky de malta* descrito en la bibliografía, no se observaron diferencias entre los contenidos de glucosa y manosa en whiskies envejecidos durante cinco y diez años³¹. En un trabajo posterior, se estudia la variación a lo largo de un año del contenido en azúcares de un whisky de malta envejecido en una barrica envinada con vino de Jerez³². Se observó que los principales monosacáridos procedentes de la madera aumentaron gradualmente en el whisky durante el envejecimiento. El aumento gradual en las concentraciones de azúcares, observado el primer año de envejecimiento, es extrapolable a los tres años, como se observa cuando se estudia el envejecimiento del whisky de malta durante este tiempo³³. Dicho aumento también se ha puesto de manifiesto en vinos tintos envejecidos en barricas de roble^{40,41}, especialmente, la arabinosa fue la pentosa que mostró un aumento más claro durante el envejecimiento.

* El tiempo que permanece en barrica (nueva o envinada) el whisky de malta varía desde los reglamentarios tres años, hasta los veinte, treinta o incluso cincuenta.

Hitos, P. et al.²⁹ realizaron una caracterización analítica del Brandy de Jerez con el objetivo de clasificar una muestra problema en uno de los tres tipos comerciales: Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva mediante análisis lineal discriminante (ALD). Los grupos de compuestos incluidos en la caracterización fueron compuestos volátiles, azúcares, aldehídos, ácidos fenólicos y cumarinas. Para los brandies objeto de estudio, fueron clasificados correctamente el 95 % de los Solera, el 80 % de los Solera Reserva y el 91,7 % de los Solera Gran Reserva. Arabinosa fue una de las nueve variables incluidas en la función de clasificación (de un total de 52 compuestos) y a la que se atribuye una evolución significativa durante el envejecimiento.

La evolución de los azúcares en un brandy de sidra, ha sido estudiada con el objetivo de clasificar las muestras en función del tiempo de envejecimiento* (según si el brandy fue envejecido durante 12 meses o menos, o bien durante más de 12 meses) y del tipo de madera empleada en el mismo (roble americano o roble francés)³⁰. La regla de decisión matemática establecida para clasificar los brandies de sidra presentó unas capacidades de predicción del 92 % y 97 % utilizando ALD y análisis bayesiano, respectivamente.

3.2. COMPUESTOS DEL AROMA

Los destilados envejecidos en madera presentan un aroma complejo al que contribuyen cientos de compuestos volátiles pertenecientes a varias familias químicas como hidrocarburos, alcoholes, fenoles, ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas, aldehídos, acetales, lactonas, compuestos nitrogenados y compuestos azufrados (*tabla 6*). Todos estos componentes del aroma derivan de cada una de las etapas del proceso de elaboración. De esta forma, muchos de ellos están presentes en la uva o se originan en la fermentación alcohólica. El proceso de destilación posterior no sólo concentra el alcohol etílico del vino, sino que determina en gran medida la composición volátil que pasa al destilado. Finalmente, el envejecimiento de los destilados de vino en barricas de roble da lugar a cambios importantes en la composición volátil. Estos cambios contribuyen a modificar el perfil aromático del destilado envejecido, que adquiere importantes características sensoriales.

* En esta referencia se habla de “tiempo de envejecimiento” como del tiempo que se envejece el brandy en madera (sistema estático). Este concepto es diferente del parámetro “tiempo medio de envejecimiento”, referido al sistema dinámico.

Familias de compuestos		Compuestos de interés
Ácidos grasos		Ácido hexanoico, ácido octanoico, ácido decanoico, ácido dodecanoico, ácido tetradecanoico, ácido succínico, etc.
Ésteres		Acetato de etilo, hexanoato de etilo, heptanoato de etilo, octanoato de etilo, succinato de dietilo, tartrato de dietilo, dodecanoato de etilo, tetradecanoato de etilo, etc.
Alcoholes	Superiores	1-propanol, 2-metil-1-propanol (isobutanol), alcohol isoamílico*, 1-butanol, 1-hexanol, 2-feniletanol, etc.
	Fenoles	4-etilfenol, 4-etilguayacol, eugenol, etc.
	Otros	Cis-3-hexen-1-ol, 2,3-butanodiol, glicerina, etc.
Acetales		dietilacetal de acetaldehído (acetal), dietilacetal de formaldehído, etc.
Compuestos carbonílicos		Acetaldehído, benzaldehído, 2-furaldehído (furfural), 5-metilfurfural, 5-hidroximetilfurfural, 2-heptanona, 2-octanona, etc.
Lactonas		Cis y trans β -metil- γ -octalactona (lactona del whisky o del roble), etc.
Terpenos		Limoneno, linalol, citranelol, geraniol, nerol, β -pineno, etc.
Norisoprenoides (C ₁₃)		β -damascenona, α -ionona, β -ionona, etc.
Compuestos azufrados	Ligeros	Sulfuro de hidrógeno (SH ₂), metanotiol (MeSH), sulfuro de dietilo, etanotiol (EtSH), disulfuro de dimetilo, sulfuro de dimetilo, disulfuro de carbono (CS ₂), etc. disulfuro de dietilo
	Superiores	3-metiltiopropanol (metionol), 3-metiltiopropional (metional), 2 y 3 tiofenocarboxaldehído, acetato de 3-metiltiopropilo (acetato de metionilo), 3-metiltiopropanoato de etilo, etc.
Compuestos nitrogenados		Derivados tiazoles, etc.

Tabla 6: Principales familias de compuestos volátiles descritos en destilados (coñac, whisky, brandy, etc.).

* Se denomina “alcohol isoamílico” a la suma del 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, ya que frecuentemente solapan en cromatografía de gases.

Los alcoholes más abundantes en los destilados de vino son los alcoholes superiores, cuya formación está ligada al metabolismo de los aminoácidos durante la fermentación. Los ésteres constituyen la clase química más abundante de compuestos aromáticos en brandies. Muchos de ellos se forman durante la fermentación a partir de ácidos carboxílicos. Según Watts, V.A. et al.⁴², durante un largo proceso de destilación también pueden originarse ésteres volátiles, que pasarían al destilado. Algunos de estos ésteres podrían hidrolizarse posteriormente en el pH ligeramente ácido del destilado, dando lugar a ácidos grasos libres. A su vez, y a pesar de su baja volatilidad, algunos ácidos grasos pueden pasar directamente al destilado durante la destilación mediante la formación de un azeótropo. Sin embargo, esta última afirmación es más importante en la destilación continua que en la discontinua⁴³.

Las bebidas destiladas contienen cantidades bajas de compuestos polares como los monoácidos (ácido hexanoico, octanoico, decanoico, etc.) y diácidos (ácido succínico, fumárico, etc.). Los ácidos alifáticos se forman principalmente durante los procesos de fermentación⁴⁴ y destilación (el mecanismo se explica en el párrafo anterior). Durante el envejecimiento, se ha descrito una disminución del 6 % en los ácidos octanoico, decanoico y dodecanoico³⁴. Es preciso mencionar que estos compuestos tienen una volatilidad limitada*, por este motivo, varios autores^{44,45} han recurrido a la derivatización (silylación) previa al análisis por cromatografía de gases, con el objetivo de convertir estos compuestos polares en derivados volátiles.

Se ha descrito en la bibliografía un aumento en los ácidos totales, sobre todo ácido acético, y en los ésteres totales, especialmente acetato de etilo, durante el envejecimiento en bodega⁵⁰. Los ácidos totales presentaban niveles muy bajos inicialmente, que aumentaron rápidamente en los primeros doce meses de envejecimiento y después experimentaron un incremento más suave, mientras que los ésteres aumentaron más gradualmente durante el envejecimiento. Además, Trillo, L.M. et al.⁴⁶ han observado que los contenidos de ácido acético y acetato de etilo aumentan al descender en las “escalas de envejecimiento”, alcanzándose los valores máximos en la “Solera”. Esta acumulación de ácidos durante el envejecimiento (sobre todo ácido acético³⁴) se refleja en una disminución en el pH en las primeras etapas de permanencia en bodega (de 5 a 4 unidades^{47,48} y de 4,55 a 3,94 unidades³⁴). Para estudiar el origen del ácido acético durante el envejecimiento, Reazin, G.H.²⁷ añadió etanol radiactivo (¹⁴C) durante el envejecimiento del whisky y siguió el marcador en el acetaldehído, ácido acético y acetato de etilo. Los resultados revelaron que el 27-55 % del ácido acético provenía de la oxidación del etanol vía acetaldehído. El resto del ácido acético sería extraído de la madera. La posterior esterificación parcial del ácido acético a

* No obstante, se han incluido en este epígrafe por presentar cierta relación con el resto de compuestos volátiles mencionados.

acetato de etilo con el alcohol etílico que se encuentra en exceso justificaría el extremado aumento en la concentración de acetato de etilo⁵⁰.

En relación a los ésteres, se han encontrado en la bibliografía diversos patrones de evolución durante el envejecimiento. Guymon, J.F. et al.⁴⁹ han descrito una disminución de los ésteres etílicos de ácido graso durante el envejecimiento del brandy, especialmente el dodecanoato de etilo (laurato de etilo). No obstante, varios autores refieren un aumento de estos compuestos durante el envejecimiento^{34,50,51}. A su vez, Câmpeanu, R. et al.⁵² han observado un aumento continuo hasta los 18 meses, a partir de los cuales se produjo una disminución progresiva, mientras que Egorov, I.A. et al.⁵³ describen una disminución inicial de los ésteres, seguida de un aumento a partir de los 20 años de envejecimiento.

Onishi, M. et al.⁵⁰ observaron un aumento en los ésteres etílicos de los ácidos grasos hexanoico (caproato de etilo), decanoico (caprato de etilo) y octanoico (caprilato de etilo). Este último mostró el aumento más significativo de concentración, mientras que el dodecanoato de etilo disminuyó ligeramente, seguido del tetradecanoato de etilo (miristato de etilo) y del hexadecanoato de etilo (palmitato de etilo), que mostraron una mayor disminución de la concentración. Esta evolución es interpretada por los autores partiendo de la hipótesis de que los ácidos grasos C₈-C₁₀ superan inicialmente los niveles de equilibrio con sus ésteres, por ello, durante el envejecimiento, algunos de estos ácidos esterifican con el alcohol etílico que está en exceso. Panosyan, A.G. et al.⁵¹ mencionan un aumento significativo en las concentraciones de los ésteres etílicos (como el formiato de etilo) y del dietilacetal de acetaldehído, que estuvo acompañado por una disminución de las concentraciones de alcoholes (butanoles, hexenol, etc.). Los autores atribuyen estos cambios a la oxidación no enzimática de los alcoholes y aldehídos a ácidos, seguido de su esterificación en etanol con la formación de etilatos y acetales de aldehídos. Por ejemplo, un aumento en la concentración de formiato de etilo y dietilacetal podría deberse a la oxidación del metanol a formaldehído y luego a ácido fórmico, que a su vez, en exceso de etanol se convierten en dietilacetal y formiato de etilo, respectivamente. Cantagrel, R. et al.³⁴ también observaron un incremento de la cantidad de dietilacetal de acetaldehído durante el envejecimiento.

El succinato de dietilo y su éster monoetilo (hidrógeno succinato de etilo) han sido descritos en uvas, vino y destilados^{54,55}. Guymon, J.F. et al.⁴⁹ y Onishi, M. et al.⁵⁰ identificaron al succinato de etilo como un compuesto derivado de la madera del roble, ya que se encontró a concentraciones muy bajas o nulas en destilados no envejecidos. Además, el succinato de dietilo mostró un aumento significativo durante el envejecimiento, que fue más acusado en el roble americano que en el francés⁵⁰. Por ello, los autores consideran que el principal origen del succinato de dietilo está en la

reacción entre el alcohol etílico y el ácido succínico de la madera. Sin embargo, Onishi, M. et al.⁵⁰ también describen la presencia de una pequeña cantidad de succinato de dietilo en el destilado no envejecido. Según esto, y dado que el ácido succínico es un componente habitual del vino, plantean la hipótesis de que una cierta cantidad de este ácido podría esterificar con el etanol antes o durante el proceso de destilación. No obstante, consideran que la principal fuente de succinato de dietilo es la madera de roble.

Como se mencionó anteriormente, la acumulación de compuestos volátiles del roble en el brandy durante el envejecimiento depende de muchos factores, entre ellos, las cantidades de compuestos volátiles y sus precursores que están presentes en la madera. Otros compuestos que se han descrito como derivados del envejecimiento en madera (además del succinato de dietilo) son el furfural (2-furaldehído), 5-metilfurfural, 5-hidroximetilfurfural, *cis* y *trans* β -metil- γ -octalactona. A medida que aumenta la intensidad de tostado de la barrica, y por tanto la temperatura, muchos de los componentes de la madera sufren cambios físicos, estructurales y químicos. La degradación térmica de los polisacáridos de la madera da lugar a la formación de los aldehídos furánicos (furfural, 5-metilfurfural y 5-hidroximetilfurfural). Tal como describen Fengel, D. et al.⁵⁶, 5-hidroximetilfurfural y 5-metilfurfural proceden de las hexosas, que son los principales constituyentes de la celulosa, mientras que el furfural deriva de las pentosas, componentes mayoritarios de la hemicelulosa. Por este motivo, Caldeira, I. et al.⁵⁷ observaron un aumento significativo en las cantidades de estos compuestos en extractos hidroalcohólicos de roble americano al aumentar la intensidad del tostado.

En vista de la relación entre los aldehídos furánicos y la madera de las barricas, algunos autores han utilizado el contenido en furfural como indicador aproximado de la autenticidad y la edad de brandies y otros destilados envejecidos en barricas de roble^{58,59}. Además, Moutounet, M. et al.⁶⁰ refieren un aumento en los contenidos de furfural y 5-hidroximetilfurfural en destilados envejecidos en barricas de roble. Según se explica anteriormente, ambos aldehídos furánicos son extraídos de la madera de la bota por el destilado, sin embargo, Onishi, M. et al.⁵⁰ establecen que la extracción de aldehídos furánicos depende no sólo del tiempo que el destilado ha estado en la barrica, sino también de otros factores como el tipo de roble, tamaño de la barrica y edad de la misma. A su vez, si se tiene en cuenta que la mayoría del 5-hidroximetilfurfural encontrado en brandy embotellado es el resultado de la adición de colorante caramelo⁶¹, este compuesto difícilmente puede ser utilizado como posible marcador de la edad⁶². Por otro lado, la presencia de furfural en destilados sin envejecer ha sido justificada por varios autores^{49,50,63} como originada por el calentamiento prolongado durante la destilación, lo que llevó a Jeurings, H.J. et al.⁶³ a descartarlo como posible marcador del envejecimiento. Por este motivo, Quesada, J. et al.⁶⁴ han estudiado la

influencia de distintas condiciones de envejecimiento en el contenido en aldehídos furánicos (furfural y 5-hidroximetilfurfural) de los brandies, concluyendo la imposibilidad de recurrir a estos compuestos como marcadores de la edad, debido a que sus concentraciones se ven influenciadas por factores como el agotamiento de la barrica, las técnicas usadas en su fabricación y la presencia de colorante caramelo, así como la influencia nula del factor tiempo de envejecimiento en los contenidos de furfural y 5-hidroximetilfurfural. Los autores justifican la relación encontrada entre las concentraciones de furfural y 5-hidroximetilfurfural y la presencia de caramelo en vista de los resultados obtenidos en el estudio de las concentraciones de aldehídos furánicos en caramelos comerciales⁶⁵, donde el 5-hidroximetilfurfural fue el componente furánico más abundante.

Otros compuestos encontrados en los extractos hidroalcohólicos de roble americano (no tostado), y que por tanto podrían pasar al destilado durante el envejecimiento, fueron varios ácidos grasos (acético, hexanoico, propanoico, octanoico, decanoico, dodecanoico), *cis* y *trans* β -metil- γ -octalactona (el isómero *cis* se encontró en mayor proporción que el *trans*), guayacol y eugenol⁵⁷. Entre ellos, el contenido en eugenol, guayacol, ácidos propanoico y hexanoico, y *cis* β -metil- γ -octalactona se vieron afectados por el nivel de tostado. La presencia de eugenol es considerada como característica de las bebidas envejecidas en madera de roble²¹.

La β -metil- γ -octalactona ha recibido múltiples nombres, incluyendo *lactona del roble*, *del whisky* o *lactona Quercus*, y es uno de los principales compuestos volátiles encontrados en madera de roble sin tostar, con importantes efectos organolépticos. Sus dos estereoisómeros (*cis* y *trans* β -metil- γ -octalactona), ambos descritos en destilados^{66,67,68,50}, tienen un aroma característico a madera de roble. Según Rodríguez, R. et al.⁶⁹, la degradación térmica de la capa interna de las duelas de la barrica da lugar a una capa de carbón activo que aumenta la proporción de β -metil- γ -octalactona. En el mencionado trabajo⁶⁹, se observó que el tiempo de envejecimiento y el tipo de madera de roble afectan a los contenidos de ambas lactonas, concluyéndose que la *trans* β -metil- γ -octalactona es aportada fundamentalmente por el roble francés, mientras que el roble americano contribuye sobre todo al isómero *cis*. En este sentido, varios autores han descrito concentraciones mayores de *cis* β -metil- γ -octalactona en destilados envejecidos en roble americano en comparación con los envejecidos en roble francés, que tuvieron a la *trans* β -metil- γ -octalactona como isómero predominante^{66,70}. Egorov, I.A. et al.⁵³ han descrito un aumento de ambas lactonas durante el envejecimiento.

Según describen Álvarez, M.A. et al.⁷¹ para el Brandy de Jerez, los compuestos volátiles cedidos por las barricas al aguardiente durante el envejecimiento también pueden proceder del *envinado* de las mismas, que se realiza con vino de Jerez y constituye una de las características que diferencian al Brandy de Jerez de otras

regiones vitivinícolas. Este procedimiento inicial produce un doble efecto en las duelas de las botas: por una parte, el vino utilizado para el envinado extrae una fracción de los componentes solubles de la madera (taninos, derivados de la lignina, etc.), lo que permite obtener destilados envejecidos menos *maderizados*, más suaves y delicados; por otra parte y como resultado del envinado, las duelas cederán a los destilados componentes aportados por el vino y que quedaron retenidos en los poros de la madera. En el mencionado trabajo, se ha estudiado la incidencia del envinado en la caracterización analítica y específica del Brandy de Jerez. Las concentraciones de glicerina, tartrato de dietilo, 2,3-butanodiol y succinato de dietilo aumentaron en los aguardientes envejecidos durante tres años (por el sistema de “Añadas”) en botas envinadas, en relación a los envejecidos en botas nuevas sin envinar. Los autores establecen dos posibles fuentes de tartrato de dietilo: por un lado, el procedente del envinado de las botas y por otro, el contenido en las rasuras, que consisten básicamente en precipitados de sales cálcicas y potásicas de ácido tartárico, aunque también pueden contener sales de otros ácidos y algunos otros compuestos en función del vino que contuvieron. En el caso del succinato de dietilo, Carrascal, V.⁷² observó la cesión de ácido succínico como característica de las botas envinadas.

4. ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE CALIDAD EN ALIMENTOS Y BEBIDAS

4.1. ANÁLISIS DE AZÚCARES

Los azúcares estudiados más frecuentemente en alimentos y bebidas se encuentran clasificados según su naturaleza química en la *tabla 7*. Asimismo, se ha llevado a cabo un estudio detallado sobre el análisis de azúcares en alimentos y bebidas, que ha sido publicado como *review* en la revista CHROMATOGRAPHIA⁷³.

Monosacáridos	Aldosas	Eritrosa (4C), ribosa (5C), arabinosa (5C), xilosa (5C), manosa (6C), glucosa (6C), galactosa (6C).
	Cetosas	Fructosa (6C), sorbosa (6C)
Disacáridos	Sacarosa, lactosa, lactulosa, maltosa, isomaltosa, trealosa, celobiosa, kojibiosa, turanosa, nigerosa, theanderosa (derivado de la sacarosa)	
Trisacáridos	Rafinosa, maltotriosa, isomaltotriosa, melecitosa, erlosa, panosa	
Desoxiazúcares	Fucosa, ramnosa	
Ácidos urónicos	Ácido galacturónico, glucurónico y manurónico	
Ácidos aldónicos	Ácido glucónico	
Alditales	Sorbitol (D-glucitol), manitol, arabitól, glicerol, galactitol (dulcitol), meso-eritritol, xilitol	
Glicósidos de alditol	Maltitol, isomaltitol, lactitol	
Polioles	Inositol (poliol cíclico)	
Amino azúcares	Glucosamina, galactosamina, N-acetilgalactosamina, N-acetilglucosamina	
Anhídridos	Dianhídridos de di-D-fructosa	
Polisacáridos	(No determinados)	

Tabla 7: Clasificación de los azúcares encontrados en alimentos y bebidas.

Existe una gran variedad de métodos para el análisis de azúcares en alimentos y bebidas. Siendo los métodos cromatográficos y afines los más usados para el análisis de hidratos de carbono, han sido muchos los métodos no cromatográficos descritos para este fin, como los espectrofotométricos⁷⁴, isotópicos^{75,76,77,78,79,80}, resonancia de plasma de superficie⁸¹, espectrometría de masas de Transformada de Fourier con ionización en electrospray⁸², biosensores enzimáticos^{83,84,85,86,87,88} análisis de inyección de flujo^{89,90,91}. Los métodos cromatográficos y afines empleados para la separación y

detección de azúcares son la cromatografía de gases (GC)^{92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104}, la electroforesis capilar (CE)^{105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119} y la cromatografía en capa fina de alta eficacia combinada con el desarrollo múltiple automatizado (HPTLC-AMD)¹²⁰.

4.1.1. Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC o CLAE)

4.1.1.1. Preparación de muestra

La preparación de muestra se limita en muchas ocasiones a dilución y filtración, como ocurre con mosto y vino^{121,122,123,124}, cerveza^{122,125}, infusiones y bebidas no alcohólicas^{126,127}, zumos de frutas^{121,122,125,126,128}, licor¹²¹, leche y suero^{125,126,129} y miel¹³⁰. Si se trata de bebidas carbonatadas, es necesaria la desgasificación en baño de ultrasonidos¹³¹, que también se ha empleado en muestras de cerveza^{132,133}.

Otros tratamientos descritos fueron la extracción en fase sólida para purificar muestras de cerveza¹³⁴, zumo de remolacha¹³⁵, mosto y vino¹²⁴; la adición de acetonitrilo a muestras de cerveza para precipitar las proteínas y el almidón^{132,136}; la centrifugación de zumo de melocotón para recoger el sobrenadante¹³⁷ y la dilución de muestras de leche con ácido sulfúrico (precipita las proteínas) seguido de filtración en vacío para eliminar el precipitado¹²⁶. Los brandies de sidra fueron evaporados a sequedad y posteriormente reconstituidos con agua³⁰. Greenway, G.M. et al.¹³¹ y Vérette et al.¹³⁸ han puesto a punto un sistema completamente automático capaz de eliminar interferencias de macromoléculas y micropartículas mediante diálisis de alta resolución, que ha sido aplicada a una gran variedad de muestras: bebidas no alcohólicas (colas), productos lácteos (yogur líquido, leche infantil reconstituida, etc.), zumos de frutas y bebidas fermentadas (sidra, vino).

Con respecto a la derivatización, se han encontrado varios procedimientos en la literatura con el objetivo de aumentar la sensibilidad y selectividad del análisis, así como de hacer posible la aplicación de HPLC en fase inversa a la determinación de azúcares. La derivatización presenta, sin embargo, algunas desventajas, ya que aumenta el tiempo de preparación de muestra y puede producir interferencias por parte de otros reactivos presentes en las muestras. Los procedimientos de derivatización descritos en la bibliografía son los siguientes:

- Formación de piridil amino oligosacáridos¹³⁹.
- Generación de complejos aniónicos de alditoles con molibdato¹⁴⁰.

- Reacción pre-columna con fenilisocianato, que produce compuestos activos en el ultravioleta^{141,142}.
- Reacción post-columna con benzamidina en medio alcalino, que proporciona derivados fluorescentes¹⁴³.
- Reacción post-columna con una mezcla de hidrocloreto de guanidina, ácido periódico e hidróxido potásico a 146 °C, que genera derivados fluorescentes¹⁴⁴.
- Derivatización pre-columna con cloruro de p-nitrobenzoilo para obtener derivados de alcoholes de azúcar activos en el ultravioleta¹⁴⁵.
- Derivatización pre-columna con el etil éster de ácido p-aminobenzoico en presencia de cianoborohidruro sódico, para obtener derivados activos en el ultravioleta^{30,146}.

4.1.1.2. Principios de la separación

La filtración y desgasificación con helio de los eluyentes antes de su uso, así como la filtración de las muestras con filtros de 0,45 µm, constituyen prácticas generalizadas en el análisis por HPLC. También es frecuente el uso de una precolumna de idéntico relleno al de la columna analítica, que actúa como filtro para alargar la vida útil de ésta y asegurar resultados fiables y reproducibles.

Los tipos de cromatografía utilizados principalmente para la separación de carbohidratos son la cromatografía en fase ligada; la cromatografía iónica con una resina de intercambio iónico como fase estacionaria; y la cromatografía de exclusión iónica.

En el caso de la cromatografía de fase ligada, se utilizan columnas con un relleno de un grupo amino enlazado a sílica gel o a un polímero^{130,132,134,138,143,147,148,149}. Se ha descrito una columna de sílica gel dinámicamente modificada con etilendiamina que mostraba la misma eficacia que la columna de fase amino, pero sin embargo era más estable durante la separación, debido a su continua regeneración¹²¹. Las fases móviles empleadas fueron mezclas acetronitrilo:agua. La determinación de sacáridos mediante HPLC en fase inversa C₁₈^{131,139,142,145,150} nos asegura la cuantificación de azúcares a nivel de trazas, incluyendo los no reductores (mediante un gradiente de elución)¹⁵⁰. También se han determinado azúcares en columnas C₈³⁰. Las fases móviles utilizadas en fase inversa estuvieron compuestas por H₂O y MeOH¹³¹, tampón de ácido acético-amónico (pH 4) y alcohol n-butílico¹³⁹, acetronitrilo y agua^{142,145}, tampón de citrato sódico, tetrahidrofurano y acetronitrilo¹⁴⁶.

En la cromatografía de intercambio iónico, se ha descrito el uso de resinas de intercambio catiónico como fase estacionaria^{122,123,124,126,137,138,151,152,153,154,155}; éstas pueden ser resinas de intercambio catiónico en la forma hidrógeno empaquetadas con copolímeros sulfonados de estireno divinil benceno. Las fases móviles empleadas en intercambio catiónico fueron disoluciones de ácido sulfúrico^{123,126,138,151,152,153,154,155} o mezcla de este ácido con acetonitrilo^{122,124,137}. Las resinas de intercambio aniónico consistieron en fases del tipo poliestireno-divinilbenceno enlazado a aminas cuaternarias¹²⁵. Yamamoto et al. utilizaron una columna con un relleno de resina polimérica enlazada a grupos octadecilo que se cubre dinámicamente con cetiltrimetilamonio¹⁴⁰. De esta forma se pudieron separar, por intercambio aniónico, complejos aniónicos de D-sorbitol y D-manitol con molibdato. Las fases móviles para intercambio aniónico fueron disoluciones de hidróxido sódico¹²⁵ y mezcla de molibdato sódico y ácido nítrico¹⁴⁰. La cromatografía de intercambio de ligando es un tipo de cromatografía de intercambio iónico que permite una determinación muy selectiva de carbohidratos^{128,129,143,156,157,158,159,160}. Las fases estacionarias más comúnmente empleadas están compuestas por poliestireno-divinilbenceno sulfonado con cationes Ca^{2+} ó Na^+ . Las fases móviles descritas en este tipo de cromatografía fueron agua pura^{128,129,143} y disoluciones de Ca-EDTA¹⁵⁶. En el caso de la detección fluorescente, el eluyente que sale de la columna pasa a través de un reactor en fase sólida para hidrolizar los azúcares no reductores en azúcares reductores¹⁴³. El eluyente que sale del reactor se mezcla con benzamidina e hidróxido de potasio para formar los derivados fluorescentes.

La cromatografía de exclusión iónica se ha empleado para la separación de azúcares y polioles¹⁶¹. Las fases móviles ensayadas para este tipo de columna fueron agua tamponada a distintos valores de pH o disoluciones diluidas de ácidos como el sulfúrico o el fosfórico. Las condiciones óptimas para la separación resultaron no ser las mismas que para la detección amperométrica sensible de los analitos, por lo que es necesario un compromiso entre ambos parámetros que proporcione unas condiciones adecuadas para la separación y la detección.

La cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia (HPAEC)^{133,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172} fue desarrollada para la separación de carbohidratos. Este tipo de cromatografía aprovecha el carácter débilmente ácido de los carbohidratos y alcoholes de azúcar para proporcionar separaciones altamente selectivas a pH elevado, usando como fase estacionaria un fuerte intercambiador de aniones (en detalle más adelante).

4.1.1.3. Detectores

El detector ideal para HPLC debe tener una sensibilidad adecuada, buena estabilidad y reproducibilidad, respuesta lineal y debe ser no destructivo. El detector universal no existe en HPLC, por tanto el sistema de detección usado dependerá de la naturaleza de la muestra.

El detector de índice de refracción (RI) es el más utilizado para el análisis de azúcares. También se ha empleado la detección UV-visible, el detector de luz dispersada tras evaporación (light scattering o ELSD) y la detección electroquímica.

El detector de índice de refracción^{122,123,124,127,128,129,130,131,136,137,138,147,148,151,152,153,154,155,156,157,159} no es selectivo, debido a que se basa en los cambios en el índice de refracción que experimenta la solución que pasa a través de una célula de flujo. Como desventajas de este detector, es preciso destacar que tiene una sensibilidad limitada, no permite la elución en gradiente y es muy sensible a cambios en el flujo y la temperatura.

Un tipo de detector de absorción UV-visible es el detector de fotodiodos alineados (DAD). La absorción ultravioleta en el rango 190-210 nm se utiliza en el análisis de aldosas, cetosas, disacáridos y desoxiazúcares no derivatizados^{124,128,149,154,155}. Se ha utilizado una longitud de onda de 260 nm en el caso de derivados de alcoholes de azúcar con cloruro de p-nitrobenzoílo¹⁴⁵, mientras que el meso-inositol fue detectado a 240 nm después de la derivatización con fenilisocianato¹⁴². Los derivados de aldosas y ácidos urónicos con el etil éster de ácido p-aminobenzoico fueron monitorizados a 307 nm y el espectro de absorción de los compuestos se registró entre 250 y 350 nm³⁰. Para una detección altamente selectiva de los enantiómeros D-manitol y D-sorbitol, se utilizó un detector fotométrico con polarizadores incorporados¹⁴⁰. La formación de complejos aniónicos entre estos alditoles y el molibdato, en medio de baja acidez, hace rígidas sus estructuras y aumenta la rotación óptica, lo que permite su detección selectiva a 600 nm.

El detector de luz dispersada tras evaporación (ELSD)^{121,132,134,135} es apropiado para la detección de compuestos no volátiles como lípidos y carbohidratos. Una de las mayores ventajas es que presenta aproximadamente la misma respuesta para todos los solutos no volátiles. Comparado con el detector de índice de refracción, el detector ELSD proporciona una mayor sensibilidad (límites de detección de 0.2 µg/mL), mayor estabilidad de la línea base y no se ve afectado por la temperatura.

La detección electroquímica^{29,40,125,126,128,129,133,161,162,163,164,165,166,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190} permite la detección directa de

carbohidratos, además de proporcionar una elevada sensibilidad y selectividad frente a la naturaleza compleja de las muestras naturales de carbohidratos (ver más adelante).

La combinación de HPLC y espectrometría de masas (MS) se ha aplicado al análisis de oligosacáridos¹³⁹. Se concluyó que los oligosacáridos marcados con 2-aminopiridina podían ser analizados bajo las mismas condiciones usadas para la separación por HPLC, a pesar de que el espectro de masas se viera afectado. De esta forma, se utilizó HPLC acoplada con MS para analizar una mezcla de piridilamino-oligosacáridos. Bruggink, C. et al.¹³³ han desarrollado un sistema que combina la detección amperométrica con la espectrometría de masas. En el sistema analítico, ambos detectores se sitúan en paralelo a la salida de la columna analítica. Los eluyentes comunes para HPAEC, como el hidróxido sódico y el acetato sódico, son beneficiosos para la detección amperométrica pero no son compatibles con la ionización en electrospray. Por este motivo, se situó un dispositivo de membrana desalinizadora antes de la interfase de ionización en electrospray, de forma que transformara el hidróxido sódico en agua y el acetato sódico en ácido acético. Para mejorar la sensibilidad de la detección mediante MS, se adicionó cloruro de litio a la salida de la membrana, con el objetivo de formar aductos de litio con los carbohidratos. Este sistema combina la separación efectiva proporcionada por HPAEC con la identificación rápida de los carbohidratos en función de su relación masa/carga, permitiendo un mayor desarrollo en el análisis de carbohidratos.

4.1.2. Aplicaciones de la determinación de azúcares.

Las aplicaciones del análisis de azúcares desarrolladas durante los últimos años están orientadas hacia el control de procesos^{74,82,107,108,112,117,123,124,137,146,157} desarrollo de productos^{109,149} y control de calidad del producto acabado (determinación de la autenticidad y adulteración)^{75,76,77,78,79,80,93,98,99,103,105,113,132,133,160,186,191}.

Con respecto a las aplicaciones en el campo del control de procesos, se han utilizado estas técnicas para el análisis de rutina en la producción de vino blanco¹²³. El análisis de azúcares es muy importante en la industria del vino, ya que es frecuentemente requerido para la evaluación de la calidad y la caracterización de uvas, mostos y vinos¹²⁴. La caracterización de zumos procedentes de tres variedades distintas de melocotón cultivadas en Italia, reveló la importancia de la variedad de melocotón en la composición del zumo¹³⁷. Picinelli, A. et al.¹⁵⁷ desarrollaron una caracterización química de sidras asturianas con el objetivo de correlacionar la composición química de la sidra y el origen de las manzanas utilizadas (depende del año de producción, debido a que en Asturias las manzanas de sidra son un cultivo bienal). Otra

caracterización química de la sidra, basada en las concentraciones de componentes volátiles y no volátiles, permitió clasificar las sidras según sus propiedades espumantes⁷⁴. La determinación de monosacáridos en sidra reveló diferencias en el contenido de aldosas y ácidos urónicos entre las sidras naturales (obtenidas mediante el prensado y fermentación del zumo de manzana) y las sidras espumosas (obtenidas a partir de zumo de manzana concentrado sometido a dilución y fermentación)¹⁴⁶.

Una gran variedad de métodos han sido desarrollados y adaptados para determinar un amplio rango de azúcares y derivados (alcoholes de azúcar, etc.) en bebidas como zumos de frutas, vino, cerveza, bebidas no alcohólicas, etc.^{107,108,112,117,127,132,133}.

Una aplicación importante de la determinación de azúcares al desarrollo de productos consiste en la determinación de alcoholes de azúcar (formas reducidas de las correspondientes aldosas y cetosas). La baja higroscopicidad y alta estabilidad de los polioles ha despertado un interés creciente en la industria de los alimentos. Chen, M.C. et al.¹⁰⁹ han desarrollado un sistema analítico para la determinación de alditos y alcoholes, que fue aplicado al análisis de bebidas alcohólicas.

La producción de kiwi constituye una actividad agrícola muy importante en Grecia. El porcentaje que no se vende (debido a su apariencia o al exceso de demanda) se puede emplear para elaborar bebidas fermentadas. Se ha realizado una caracterización de estas bebidas fermentadas obtenidas a partir del kiwi con el objetivo de maximizar la cantidad de zumo extraído del material de partida, evaluar la composición de la bebida y optimizar su calidad de acuerdo con las preferencias de los consumidores¹⁴⁹.

Son muy importantes las aplicaciones del análisis de carbohidratos al control de calidad del producto acabado, que permite la determinación de la autenticidad y adulteración de los alimentos. Con ese objetivo, se ha realizado una caracterización de la composición del zumo de piña concentrado comercial, que podría ser útil para evaluar la autenticidad de los zumos de piña concentrados comerciales¹⁶⁰. Es difícil detectar la adulteración de alimentos ricos en hidratos de carbono, como los zumos de frutas, debido a la existencia de una gran variedad de edulcorantes comerciales diseñados para coincidir exactamente con los perfiles de carbohidratos mayoritarios de estos alimentos. Se han desarrollado métodos muy variados para detectar la adición de diversos tipos de adulterantes a los zumos de frutas^{75,77,79,80,186,191}, como los derivados del maíz y la caña de azúcar^{76,78}. Con respecto a la adulteración con jarabes de maíz (se explica más adelante, en la sección de aplicaciones de HPAEC-PAD), la fracción de oligosacáridos revela siempre la presencia de maltosa, isomaltosa, maltotriosa y otros polímeros de la glucosa¹⁰³. En los zumos elaborados a partir de zumo concentrado,

algunos oligosacáridos (oligosacáridos endógenos) están presentes en cantidades reducidas, lo que no impide la detección de la adición fraudulenta de azúcares invertidos.

Noe et al. desarrollaron un método para la separación de D y L aldohexosas¹¹³ que fue aplicado más tarde al análisis rápido de enantiómeros de azúcares reductores en bebidas como el vino y los zumos de frutas¹⁰⁵. Las pentosas se encuentran en el mosto formando parte de complejos polisacáridos, cuya ruptura durante la fermentación (para producir vino) libera las pentosas, que no pueden ser fermentadas por las levaduras. Como resultado, la cantidad de L-arabinosa puede aumentar en gran medida. Adicionalmente, una infección por *Botrytis cinerea* o un tratamiento enzimático pueden conducir también a elevadas cantidades de L-arabinosa, ácido galacturónico y otros azúcares. El zumo de manzana contiene principalmente D-glucosa y sólo pequeñas cantidades de pentosas. La fermentación produce una disminución de la glucosa y un aumento de D-xilosa, L-arabinosa, D-galactosa y ácido D-galacturónico. El patrón de sustancias adicionales no identificadas podría servir como “huella” para distintos tipos de manzanas y marcas.

La medida de los azúcares en frutas o productos frutales es de considerable importancia desde el punto de vista de la validación de la autenticidad, valoración de la calidad y grado de maduración y control de la posible alteración microbiológica durante el almacenamiento. Debido a ello, se han desarrollado métodos para el análisis de azúcares en uvas⁹³ y en los frutos del árbol del paraíso (*Elaeagnus angustifolia* L.)⁹⁹.

4.1.3. Cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia (HPAEC) con detección amperométrica de pulsos (PAD).

La determinación de carbohidratos mediante cromatografía ha estado impedida por dos factores: la inexistencia de un método de separación de alta resolución (los carbohidratos son difíciles de separar por la cromatografía líquida convencional) y la imposibilidad de detectar carbohidratos a bajos niveles¹⁹², debido a la carencia que presentan estos compuestos de grupos cromóforos o fluorescentes apropiados y a la limitada sensibilidad que ofrece la detección por índice de refracción.

La cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia (HPAEC) fue desarrollada para la separación de carbohidratos. Acoplada con la detección amperométrica de pulsos (PAD), permite la cuantificación directa de carbohidratos no

derivatizados a niveles de picomoles con una mínima preparación de muestra. La cromatografía HPAEC aprovecha el carácter débilmente ácido de los carbohidratos y alcoholes de azúcar para proporcionar separaciones altamente selectivas a pH elevado, usando como fase estacionaria un fuerte intercambiador de aniones. Este acoplamiento entre cromatografía líquida y detección electroquímica ha permitido la detección de carbohidratos en una gran variedad de matrices complejas, como alimentos, bebidas, productos lácteos, etc. Tanto HPAEC como PAD necesitan fases móviles de elevado pH, que permitan la separación cromatográfica de los azúcares en forma aniónica (mediante intercambio aniónico) y su posterior oxidación en el electrodo.

4.1.3.1. Preparación de muestra

Las muestras de vino y cerveza fueron diluidas y filtradas antes de la inyección¹⁷³, al igual que las de zumo de naranja^{171,172}. Mientras que las muestras de vino blanco sólo necesitaron filtración, se ha descrito la extracción en fase sólida C₁₈ de soluciones de café instantáneo, vino tinto y rosado (precedido de filtración del vino) para eliminar los pigmentos, que se acumulaban en la columna produciendo un aumento en la presión y una menor resolución¹⁶⁷. En el caso de muestras sólidas, se realizaron diferentes extracciones sólido-líquido, que se detallan en la *tabla 8*.

Matriz ^{referencia}	Extractante	Tratamiento posterior a la extracción
Queso ¹²⁹	H ₂ O a 50 °C con agitación	Filt.
Chicle y regaliz ¹⁶³	H ₂ O a 60 °C	Centrif., filt. de la suspensión, dil. y filt.
Galletas, chocolate y tarta ¹⁶⁴	H ₂ O y sonicación	Tratamiento con los reactivos de Carrez (para eliminar proteínas y grasas), dil. y filt.
Caramelos ¹⁶⁴	H ₂ O y sonicación	Dil. y filt.
Té en polvo ¹⁶⁵	H ₂ O hirviendo	Filt. y dil.
Chicle ¹⁶⁶	H ₂ O y sonicación en frío, H ₂ O a 60 °C con agitación	Enfriamiento, filt., dil., SPE ^a , dil., adición de estándar interno.

Tabla 8: Extracciones sólido-líquido en muestras sólidas.

Las muestras de suero de leche fueron almacenadas en frío después de la adición de azida sódica para evitar el crecimiento de bacterias y hongos¹⁶⁸. La preparación de las muestras de leche y suero consistió en precipitación de las proteínas con los reactivos de Carrez, seguida de centrifugación para eliminar las grasas^{168,169}. Antes del análisis, el sobrenadante fue diluido con agua y filtrado.

Con el objetivo de separar las fracciones de monosacáridos y oligosacáridos (presentes en la miel) para su posterior análisis, se utilizó una columna de vidrio empaquetada con carbón activado y celita¹⁶². En primer lugar, la miel se disuelve en agua y se añade el carbón activado, la mezcla se agita durante 18 horas y luego se añade a la columna de vidrio. Los monosacáridos y oligosacáridos fueron eluidos de la columna con mezclas etanol:agua de distintas proporciones. Otro tratamiento descrito para la miel consiste en la extracción en fase sólida (con una resina de intercambio aniónico) de las muestras diluidas de miel¹⁷⁵.

Se ha empleado la hidrólisis en el análisis de pectinas procedentes de zumos de manzana licuada¹⁹³. Antes de la hidrólisis principal, la materia seca fue sonicada con ácido sulfúrico. Para la hidrólisis principal, se añade agua y se calienta la mezcla. Una vez que la muestra ha vuelto a temperatura ambiente, se le añade agua bidestilada, se filtra la muestra y se inyecta en el equipo.

4.1.3.2. Principios de la separación por cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia (HPAEC)

La cromatografía iónica es un procedimiento de separación de iones de carga del mismo signo por elución en una columna empaquetada con resina finamente dividida. Se ha descrito el uso de resinas de intercambio aniónico^{162,163,165,168,169} y de resinas poliméricas macroporosas^{163,164,166}; las resinas de intercambio aniónico son fases del tipo poliestireno-divinilbenceno^{162,165,167,168,171,172} o etilvinilbenceno-divinilbenceno sulfonado^{164,170}, ambos enlazados a aminas cuaternarias (fuertes intercambiadores aniónicos).

En la *tabla 9* se comparan las principales columnas de intercambio iónico. La columna CarboPac PA1 (utilizada en este trabajo) se considera como la más adecuada para el análisis de monosacáridos. Esta columna está empaquetada con unidades de resina polimérica no porosa, denominada *MicroBead*. Este tipo de resinas presentan una rápida transferencia de masa, una elevada estabilidad frente al pH (pH 0-14) y una excelente resistencia mecánica que les permite soportar presiones de hasta 4000 psi (28

MPa). La regeneración de la columna después de un análisis en gradiente es rápida (suele durar 10 minutos o menos). En la *figura 8* se muestra una unidad de resina polimérica *bead*.

Características	CarboPac MA1	CarboPac PA1	CarboPac PA-100
Aplicaciones recomendadas	Análisis de alcoholes de azúcar (mono- y disacáridos) en alimentos, fluidos fisiológicos y sacáridos glicoconjugados reducidos	Análisis composicional de monosacáridos, separaciones de homopolímeros lineales y purificación de sacáridos	Análisis y determinación de oligosacáridos
Composición de la resina	Sustrato macroporoso de cloruro de vinilbencil/divinilbenceno (diámetro: 8.5 µm) totalmente funcionalizado con un grupo amonio alquil sustituido	Sustrato de poliestireno/divinilbenceno (diámetro: 10 µm) aglomerado con una red de aminas cuaternarias funcionalizadas de <i>MicroBead</i> de 350 nm	Sustrato de etil vinil benceno/divinilbenceno (diámetro: 10 µm) aglomerado con una red de aminas cuaternarias funcionalizadas de <i>MicroBead</i> de 350 nm
Capacidad de intercambio aniónico	4500 µeq para una columna de 4x250 mm	100 µeq para una columna de 4x250 mm	90 µeq para una columna de 4x250 mm
Velocidad de flujo recomendada	0.4 mL/min (para una columna de 4x250 mm)	1 mL/min (para una columna de 4x250 mm)	1 mL/min (para una columna de 4x250 mm)
Rango de pH compatible	0-14	0-14	0-14
Compatibilidad con disolventes orgánicos	0%	0-2%	0-100%
Presión máxima permitida	2000 psi (14 MPa)	4000 psi (28 MPa)	4000 psi (28 MPa)

Tabla 9: Comparación de las columnas CarboPac MA1, PA1 y PA-100.

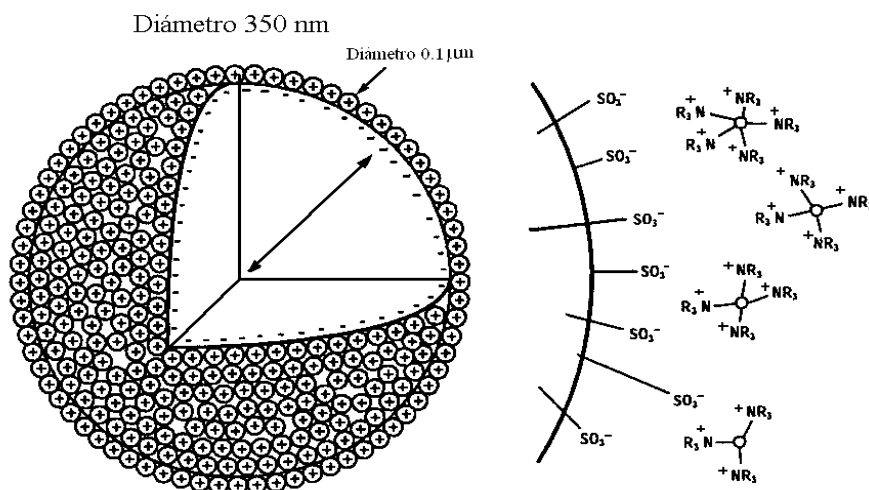
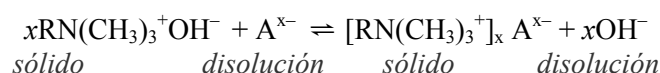


Figura 8: Unidad de resina polimérica bead.

El intercambio aniónico que se produce en la columna cuando la muestra (que contiene analitos aniónicos A^{x-}) interacciona con el intercambiador aniónico, se describe mediante el siguiente equilibrio:



Donde R representa la parte de la molécula de la resina que contiene una amina cuaternaria. La elución se produce debido a que la fase móvil que transporta la muestra contiene un ión que compete con los analitos iónicos por los grupos cargados sobre la superficie de la resina.

Debido a que los azúcares neutros y los alcoholes de azúcar son ácidos débiles (tienen valores de pK_a entre 12 y 14, ver *tabla 10*), se necesitan fases móviles fuertemente alcalinas para que los carbohidratos estén en su forma aniónica y puedan ser separados por cromatografía de intercambio aniónico (a elevado pH, los grupos hidroxilo de los carbohidratos estarán total o parcialmente transformados en oxianiones). Esto no es posible con las columnas clásicas basadas en sílice porque el elevado pH disuelve el relleno¹⁹⁴. Los tiempos de retención están directamente relacionados con el pK_a del compuesto. Este tipo de cromatografía tiene en cuenta los

pK_a de todos los grupos hidroxilos del azúcar, lo que permite separar isómeros como galactosa, manosa y glucosa (con fases móviles con $[OH^-] < 20 \text{ mM}^{189}$), que poseen el mismo peso molecular y el mismo número de grupos hidroxilo.

Azúcar	pK_a
Fructosa	12,03
Manosa	12,08
Xilosa	12,15
Glucosa	12,28
Galactosa	12,39
Dulcitol (galactitol)	13,43
Sorbitol (D-glucitol)	13,60

Tabla 10: valores de pK_a de algunos azúcares y alcoholes de azúcar.

Es importante resaltar que el elevado pH empleado en HPAEC evita la transformación de *Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein* (epimerización y tautomería ceto-enólica) de los monosacáridos^{18,189,194}. Estos compuestos siempre dan picos sencillos y estrechos bajo las condiciones de HPAEC. Lo mismo ocurre con los amino azúcares N-acetilados, que no experimentan reacciones de degradación incluso a elevadas concentraciones de hidróxido, probablemente debido a que el tiempo de separación es relativamente corto. Como los alditoles no sufren epimerización en medio básico, se puede evitar la epimerización de los oligosacáridos si éstos son reducidos a alditoles antes del procedimiento cromatográfico.

Al igual en que las técnicas de HPLC, La filtración y desgasificación con helio de los eluyentes antes de su uso, así como la filtración de las muestras con filtros de $0.45 \mu\text{m}$, constituyen prácticas generalizadas. También es frecuente el uso de una precolumna. La presencia en la fase móvil alcalina de iones Ba^{2+} mejora la selectividad y la reproducibilidad a la vez que acorta el tiempo de análisis, ya que permite la precipitación del carbonato, que constituye una sustancia interferente^{164,169}. Con esta operación no son necesarias las precauciones en la preparación del eluyente alcalino y la regeneración de la columna después de cada inyección.

4.1.3.3. Detección amperométrica de pulsos (PAD)

La detección amperométrica de pulsos^{29,40,128,129,162,163,164,166,168,169,170,171,172,173,174,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,190} permite la detección directa de carbohidratos, además de proporcionar una elevada sensibilidad y selectividad, frente a la naturaleza compleja de las muestras reales de carbohidratos.

Hughes y Johnson introdujeron en 1981 la detección amperométrica de pulso y de triple pulso^{195,196}. En 1983, Rocklin, R.D. y Pohl, C.A.¹⁹² y Edwards, P. y Haak, K.K.¹⁹⁷ aplicaron por primera vez la HPAEC acoplada con PAD a la determinación de carbohidratos. En la actualidad, HPAEC-PAD constituye el método más comúnmente utilizado para la detección de azúcares y polioles con excelente sensibilidad y selectividad, y una mínima preparación de muestra.

La amperometría de pulsos se basa en la oxidación de las moléculas en la superficie de un electrodo de oro. La corriente generada es proporcional a la concentración de azúcares, por lo que estos compuestos pueden ser detectados y cuantificados. Para comprender el mecanismo de la amperometría de pulsos, es necesario estudiar primero la oxidación de un analito mediante una técnica electroquímica convencional como la voltametría^{164,188,189,194}. La voltametría cíclica de la glucosa en hidróxido sódico 0,1 M, utilizando un electrodo de trabajo de oro y el electrodo de referencia Ag/AgCl, se muestra en la *figura 9*.

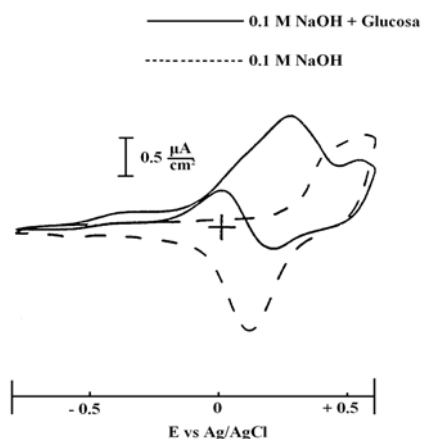


Figura 9: Voltametría cíclica de la glucosa.

La línea discontinua de la figura representa la corriente resultante del electrolito de soporte hidróxido sódico 0,1 M en ausencia de glucosa; es decir, la corriente de fondo. Comenzando a $-0,8$ V y haciendo un barrido en dirección positiva, la corriente de fondo es prácticamente despreciable hasta aproximadamente 0,25 V, donde comienza la oxidación de la superficie del electrodo de oro (formándose óxido de oro). Si se hace un barrido en sentido contrario a partir de 0,6 V, el óxido de oro vuelve a reducirse a oro, con el pico de corriente negativo a 0,1 V.

Cuando se añade la glucosa a la solución (línea continua), la corriente aumenta suavemente a medida que se hace un barrido en dirección positiva desde $-0,8$ V, hasta que empieza la oxidación de la glucosa. Esto hace que la corriente aumente a $-0,15$ V y se forme un pico a un potencial aproximado de 0,25 V. A partir de este potencial, la corriente disminuye por dos razones:

- En primer lugar, la concentración de glucosa en la superficie del electrodo ha disminuido debido a que gran parte de la glucosa ha sido oxidada.
- En segundo lugar, la formación de óxido de oro inhibe la oxidación de la glucosa.

Si se hace el barrido en sentido inverso, la corriente se invierte de reductora a oxidante (positiva) cuando comienza la reducción del óxido de oro. Al comenzar la reducción del óxido de oro, empieza también la oxidación de la glucosa.

El potencial apropiado para medir la oxidación de la glucosa sería aproximadamente 0,2 V. Éste es el potencial en el que la corriente de oxidación de la glucosa es máxima y la corriente de fondo es mínima. Sin embargo, el uso de un solo potencial produce una disminución rápida de la sensibilidad debido a que se forma una capa de óxido y los productos de la oxidación cubren y envenenan la superficie del electrodo. Por lo tanto, la superficie del electrodo debe ser limpiada entre una medida y la siguiente. Este problema se soluciona aplicando un conjunto de tres potenciales:

1. En primer lugar, la corriente de oxidación de la glucosa es medida cerca del pico a 0,25 V.
2. A continuación, se lleva el potencial a un valor positivo lo suficientemente elevado como para oxidar la superficie de oro. Esto produce la desorción de los productos de oxidación de los carbohidratos.
3. Finalmente, se lleva el potencial a un valor suficientemente negativo como para reducir por completo el óxido de oro de la superficie del electrodo, permitiendo la detección durante el siguiente ciclo. El potencial no debe ser tan bajo como para dar lugar a reducciones químicas (por ejemplo, del

oxígeno a peróxido de hidrógeno) que alterarían la línea base durante la siguiente medida al potencial E_1 .

La acción de formar y eliminar repetidamente el óxido en la superficie del metal, limpia la superficie del electrodo y la mantiene activa y estable. El conjunto de estos tres potenciales constituye una *onda* o *pulso*, y su aplicación repetida es la base de la amperometría de pulsos.

Los tres potenciales empleados se denominan E_1 , E_2 y E_3 (figura 10) y son aplicados durante los tiempos t_1 , t_2 y t_3 , respectivamente. El potencial E_1 es +0,1 V, está por debajo de la corriente del pico a 0,25 V. De esta forma, se minimiza el ruido de la corriente de fondo producida por la formación del óxido de oro y se proporciona un margen de seguridad en los cambios del potencial del electrodo de referencia. La corriente de oxidación de los carbohidratos es medida mediante la integración de la corriente de la celda después de un *delay**. La corriente integrada durante un tiempo fijo es carga, por lo que la respuesta del detector es medida en culombios. Alternativamente, puede medirse la corriente media durante el periodo de integración. En ese caso, las unidades empleadas serían amperios.

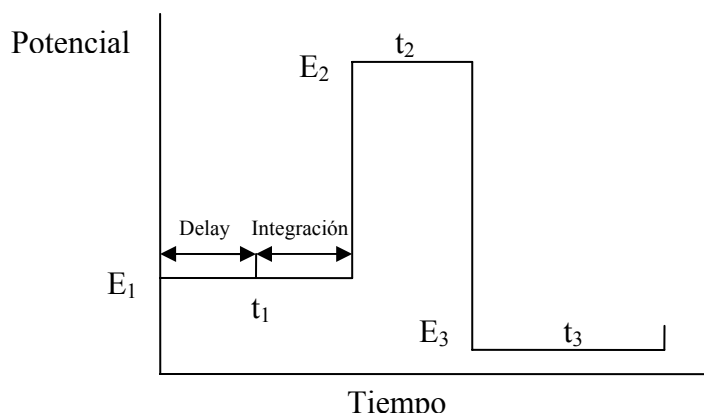


Figura 10: Diagrama de la secuencia de pulsos para la detección de carbohidratos.

* El paso de un potencial al siguiente produce una corriente de carga que no forma parte de la corriente de oxidación del analito, por tanto, la corriente de oxidación de los carbohidratos es medida después de un pequeño lapso de tiempo o *delay*, que permite que decaiga la corriente de carga.

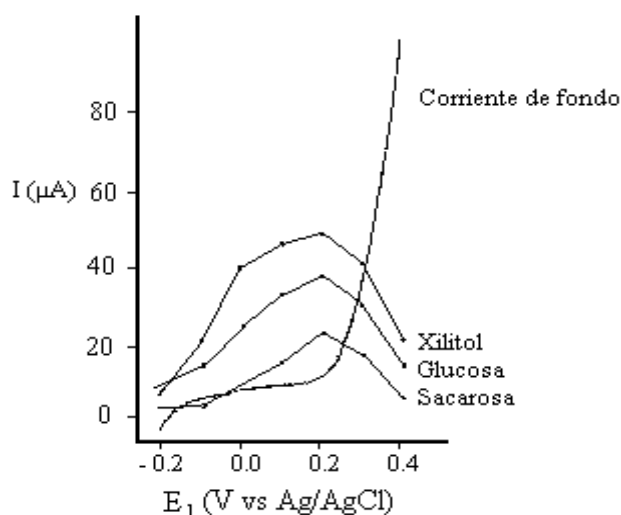


Figura 11: Corriente de oxidación generada a diferentes valores de E_1 para tres carbohidratos distintos.

La figura 11 muestra que el voltaje que produce la máxima respuesta es el mismo para tres azúcares muy diferentes: xilitol (alcohol de azúcar no reductor), glucosa (monosacárido reductor) y sacarosa (disacárido no reductor). Esto se explica porque la oxidación de los azúcares en el electrodo es catalizada por la superficie del electrodo. Como resultado, la respuesta amperométrica de una clase de compuestos es controlada principalmente por la influencia del estado de la superficie catalítica sobre el potencial de electrodo y no por los potenciales redox de los propios compuestos. La detección amperométrica de pulsos es, por tanto, un método de detección universal para todos los carbohidratos.

La técnica HPAEC-PAD es extremadamente selectiva y específica para los carbohidratos por dos motivos:

- La amperometría de pulso detecta sólo aquellos compuestos que contienen grupos funcionales oxidables al voltaje de detección empleado. En el caso de los carbohidratos, la sensibilidad es varios órdenes de magnitud mayor que para otras clases de analitos.

- Los componentes neutros o catiónicos de la muestra no se retienen, o lo hacen en pequeña medida. Por lo tanto, aunque esas especies sean susceptibles de oxidarse, no interfieren con el análisis de los carbohidratos, debido a que son eluidos con el frente del disolvente.

La detección amperométrica de pulsos (PAD) es más selectiva y sensible que la detección mediante índice de refracción (RI). El sistema PAD detecta sólo aquellos compuestos con grupos funcionales oxidables al voltaje de detección empleado, mientras que la detección RI se limita a medir los cambios en el índice de refracción de la solución que pasa a través de la celda de flujo. En relación a la sensibilidad, la detección RI es más apropiada para la cuantificación de azúcares mayoritarios (las concentraciones medidas en la bibliografía están en el rango 0,011-71 g L⁻¹), mientras que el sistema PAD es capaz de medir azúcares minoritarios a niveles de trazas (límites de detección de alrededor de 10 ppb para carbohidratos no derivatizados).

Electrodos en detección electroquímica

Aparte del sistema PAD, se han encontrado en la bibliografía otros sistemas de detección electroquímica que no van acompañados de la amperometría de pulsos. A continuación se presentan otros tipos de electrodos que no emplean el sistema PAD:

- Huang, X. et al.¹²⁶ emplearon un electrodo de óxido cuproso modificado para la detección de azúcares mediante amperometría a potencial constante con la adición post-columna de una solución concentrada de hidróxido sódico (para formar aniones de carbohidrato susceptibles de ser oxidados).
- El electrodo de cobre, utilizado para la detección amperométrica a potencial constante de azúcares y polioles^{125,161}, permite la electro-oxidación de estos compuestos sin que se produzca la absorción en el electrodo de los productos de la oxidación.
- El detector de oro/níquel¹⁶⁵ presenta como principal ventaja la posibilidad de seleccionar el modo de detección (potencial constante o detección amperométrica de pulsos), además de presentar una buena sensibilidad, estabilidad en el tiempo y un amplio rango lineal para los compuestos examinados.

Los electrodos de oro, cobre y níquel requieren condiciones alcalinas (0,8-0,012 M NaOH en la literatura) para obtener una máxima sensibilidad. La mayoría de las fases estacionarias usadas para HPLC no son estables a un pH superior a 9, por lo que la detección electroquímica se debe realizar con una adición post-columna de

NaOH a la fase móvil, como se ha descrito anteriormente¹²⁸, o con una fase estacionaria especialmente diseñada para pH elevado (en muchos casos se utilizan columnas de intercambio aniónico especialmente diseñadas para esta aplicación)¹⁸⁷.

La detección amperométrica de pulsos suele emplear electrodos de trabajo de oro^{128,162,163,164,166,168,173,175,189}. También se pueden utilizar electrodos de platino, sin embargo, el uso de los electrodos de oro tienen como ventaja que la detección se puede realizar sin la reducción simultánea del O₂ disuelto¹⁸⁸. Gey, M.H. et al.¹²⁸ recurrieron a la adición post-columna de hidróxido sódico que permitiera la formación de aniones de carbohidrato, especies susceptibles de ser oxidadas en el electrodo de oro por el sistema PAD. La separación de los carbohidratos se realizó previamente con agua pura como eluyente y fase móvil de poliestireno-divinilbenceno sulfonado con cationes Na⁺ (cromatografía de intercambio de ligando). La adición post-columna de hidróxido sódico mejoró la sensibilidad y selectividad de la determinación de carbohidratos.

Otros métodos electroquímicos

Se ha descrito el empleo de enzimas en reactores post-columna para la detección electroquímica de carbohidratos en HPLC¹⁸⁷. En estos sistemas, el enzima (o combinación de enzimas) es inmovilizado en un material de soporte poroso y luego empaquetado dentro de una pequeña columna (reactor post-columna), que se sitúa entre la columna de separación y el detector de HPLC. Cuando el analito (carbohidrato) es eluido de la columna de HPLC y pasa a través del reactor, se produce la reacción enzimática y el carbohidrato podrá ser detectado indirectamente mediante la monitorización electroquímica de los productos de la reacción. Este método se ha aplicado a una gran cantidad de mono-, di-, y oligosacáridos con la detección de H₂O₂ (para las enzimas oxidasas) o de NAD(P)H⁺ (para las deshidrogenasas). Un inconveniente de esta técnica es que en muchas ocasiones el cofactor del enzima debe ser continuamente adicionado a la fase móvil. La detección sensible y específica de azúcares (en concreto la glucosa) mediante reacciones enzimáticas utiliza electrodo de membrana con enzima inmovilizada (glucosa oxidasa)¹⁷⁶. La celda de flujo con la membrana de enzima inmovilizada se sitúa después de la columna de HPLC, de forma que la glucosa es, en primer lugar, eluida en la columna de HPLC, y después oxidada a gluconolactona y peróxido de hidrógeno en la membrana de enzima inmovilizada.

La detección electroquímica (conductimétrica y amperométrica) también es empleada en electroforesis capilar, lo que permite la detección directa de carbohidratos, además de proporcionar una elevada sensibilidad y selectividad. Se han utilizado diferentes tipos de electrodos para la detección electroquímica de azúcares en

electroforesis capilar: electrodo de cobre^{107,198,199,200,201}, de níquel^{200,202}, de pasta de carbono con el enzima glucosa oxidasa²⁰³, de óxido cuproso en pasta de carbono²⁰⁴, de platino con el enzima glucosa oxidasa²⁰¹, de oro con detección electroquímica de pulso^{205,206,207}, detección amperométrica con microelectrodo de níquel¹⁰⁹.

4.1.3.4. Aplicaciones de la determinación de azúcares por este método

Las aplicaciones del análisis de carbohidratos mediante HPAEC-PAD desarrolladas en los últimos años se pueden clasificar en dos grupos principales: desarrollo de productos^{163,164,166} y control de calidad del producto acabado (determinación de la autenticidad y posible adulteración)^{78,162,167,168,169,170,171,172,175,186,190,208,209}.

Existen numerosas aplicaciones en el desarrollo de productos; entre ellas, la determinación de alcoholes de azúcar (compuestos frecuentemente utilizados como aditivos alimentarios)^{163,164,166}. Los alcoholes de azúcar de disacárido como el maltitol, isomaltitol y lactitol son empleados cada vez más en la industria alimentaria. Estos compuestos son edulcorantes bajos en calorías que tienen el mismo poder endulzante de la sacarosa, por lo que son empleados en muchos alimentos dietéticos, como chocolates, helados y bebidas.

Como ejemplo de la aplicación de la determinación de carbohidratos al control de calidad del producto acabado, ocho zumos licuados de manzana fueron producidos con el objetivo de caracterizar el material soluble de la pared celular liberado por la acción de preparados enzimáticos pectolíticos y celulolíticos¹⁹³. Los polisacáridos estuvieron constituidos principalmente por ácido galacturónico, arabinosa, galactosa y cantidades minoritarias de ramnosa, xilosa y glucosa.

Con el objetivo de detectar la adulteración del café instantáneo, se añadieron extractos de achicoria y cereales a varias muestras de café, que fueron analizadas junto con muestras de café no adulterado¹⁶⁷. La xilosa no fue detectada en ninguna de las muestras analizadas, mientras que los niveles de glucosa y fructosa libre fueron mucho más elevados en los cafés adulterados, lo que está de acuerdo con los resultados anteriores²⁰⁹. También se encontraron niveles elevados de sacarosa en los cafés adulterados.

El control de calidad de la leche y sus derivados es muy demandado en la actualidad. Entre el elevado número de compuestos presentes en la leche entera (proteínas grasas, vitaminas, hormonas, etc.), es importante caracterizar el perfil de

azúcares presentes de forma natural, para conocer mejor sus funciones biológicas y bioquímicas en diferentes especies de mamíferos y para optimizar los procesos industriales que experimenta la leche a través del control de calidad. La determinación de mono- y disacáridos en leche entera de cabra, búfalo, oveja y vaca reveló la presencia de similares concentraciones de lactosa, frente a importantes diferencias en galactosa, glucosa y N-acetil-hexosaminas¹⁶⁹. La galactosa fue detectada en el queso mozzarella, sin embargo no fue encontrada en un sustituto de este alimento¹⁶⁹. La lactosa fue el azúcar mayoritario encontrado en el suero de leche, frente a la galactosa, glucosa, meso-inositol y N-acetil-hexosaminas como compuestos minoritarios^{168,169}.

Los hidratos de carbono, sobre todo glucosa y fructosa, son los principales constituyentes de la miel. Aparte de estos dos monosacáridos mayoritarios, alrededor de 25 oligosacáridos están presentes en la miel como componentes minoritarios (disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos). Weston, R.J. et al.¹⁶² realizaron una caracterización de mieles por su contenido y concentración relativa en oligosacáridos. Este estudio tuvo el objetivo de verificar si la capacidad bactericida de la miel *manuka* (procedente del néctar de las flores del árbol *Leptospermum scoparium*) frente a *Helicobacter pylori* y otras bacterias se debe a un tetrasacárido concreto presente en este tipo de miel. Los resultados obtenidos revelaron que no había diferencias significativas en la composición de oligosacáridos entre las mieles *manuka* con capacidad antibacteriana y las que carecían de ella.

Aparte de los adulterantes tradicionales, como el jarabe de azúcar invertido (IS) y el jarabe de maíz convencional (CCS), también se utiliza el jarabe de maíz rico en fructosa (HFCS) para la adulteración de miel²⁰⁸. IS y HFCS contienen una mezcla compleja de oligosacáridos que se forman durante los procesos de producción. La presencia de esta “huella” de oligosacáridos se puede utilizar para detectar la adición ilegal de IS y HFCS a la miel. Los perfiles de oligosacáridos de 91 mieles británicas auténticas han sido estudiados, y se han usado técnicas estadísticas multivariantes para investigar estos perfiles, que han demostrado ser herramientas útiles para investigar su origen botánico¹⁷⁵.

La adulteración de zumos de frutas por adición de azúcares es uno de los tipos de adulteración más frecuentemente practicadas en estos productos^{78,186}. Los azúcares adulterantes son generalmente sacarosa, jarabe de maíz rico en fructosa (HFCS), jarabe de azúcar invertido de caña de azúcar (CMIS) y de remolacha (BMIS). El desarrollo de productos resultantes de la transformación de la sacarosa (de caña o de remolacha) y del almidón (de maíz), altera la problemática de la detección de la adulteración de zumos de frutas por adición de azúcares, ya que se trata de fuentes baratas de azúcares a partir de los cuales es posible preparar, por hidrólisis ácida o enzimática, mezclas de sacarosa:glucosa:fructosa similares a las encontradas habitualmente en zumos. Sin

embargo, durante la preparación de estos derivados, ya sea en medio ácido o en presencia de enzimas, se forman productos secundarios (oligosacáridos) por un proceso llamado “reversión”. El perfil de estos oligosacáridos no depende del origen botánico de los azúcares, ya que fueron obtenidos experimentalmente, y está condicionado por el método de preparación (enzimática o por calentamiento en medio ácido), el tiempo de hidrólisis, la concentración y la naturaleza de los azúcares presentes en el medio de reacción.

Mediante el estudio del perfil de oligosacáridos presentes en el zumo, podría ser detectada una adulteración por adición de azúcares modificados. Sin embargo, uno de los inconvenientes de este método es que algunos de los resultados obtenidos pueden necesitar confirmación por el método de los isótopos estables. Además, a la hora de utilizar estos parámetros, es preciso analizar previamente zumos industriales auténticos, tener una colección de adulterantes y realizar los análisis en las mismas condiciones, para asegurar la fiabilidad de los resultados.

Se han desarrollado varios métodos que utilizan el sistema HPAEC-PAD para detectar la adulteración zumos de frutas con azúcar invertido de remolacha (BMIS)¹⁷⁰. Swallow et al. sugieren el uso del patrón de oligosacáridos que aparecen a tiempos de retención elevados para identificar la adulteración de zumos de naranja¹⁹⁰. Tsang, W.S.C. et al. han utilizado la rafinosa* como indicador de la adulteración del zumo de naranja^{171,172}. Un tercer método, similar al utilizado por Swallow et al., utiliza una única columna analítica y estudia también el perfil de oligosacáridos que aparecen a tiempos de retención elevados como indicativo de la adulteración con BMIS. Los métodos basados en el patrón de oligosacáridos tardíos se basan en la distinción entre las concentraciones normales de estos compuestos y las concentraciones elevadas causadas por la adulteración. La rafinosa, sin embargo, no se encuentra en el zumo de naranja puro, por lo que su presencia es indicadora de la adulteración con BMIS. La composición de BMIS puede variar significativamente en rafinosa y oligosacáridos tardíos, lo que dificulta la determinación precisa de la adulteración, que no obstante se puede estimar a niveles del 5 %.

* Rafinosa: trisacárido de D-glucosa, D-fructosa y D-galactosa.

4.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORCIÓN EN EL INFRARROJO

En este apartado de los antecedentes se ha recopilado la bibliografía relacionada con el análisis, mediante espectroscopia infrarroja, de bebidas: zumos de frutas, miel, bebidas sin alcohol, cerveza, mostos, vinos, vinagres y bebidas espirituosas. La revisión se ha centrado en la detección y cuantificación de azúcares y compuestos del aroma en dichas matrices.

4.2.1. Introducción

El fundamento de la espectroscopia infrarroja (IR) es la medida de la cantidad de radiación infrarroja que es absorbida (o emitida) por una muestra en función de la longitud de onda (o del *número de ondas**) y puede medirse en la modalidad de transmisión o de reflectancia, siendo más popular la primera de ellas. La absorción de radiación es el resultado de los cambios energéticos producidos en las transiciones de las moléculas de unos estados de energía vibracionales a otros. La región del infrarrojo del espectro abarca la radiación con números de onda comprendidos entre 12.800 y 10 cm^{-1} , que corresponden a longitudes de onda de 0,78 a 1000 μm . El espectro infrarrojo se divide en tres regiones denominadas infrarrojo cercano (12.800-4000 cm^{-1}), medio (4000-200 cm^{-1}) y lejano (200-10 cm^{-1}). Las regiones del infrarrojo medio y cercano han sido las más utilizadas en la bibliografía.

La espectroscopia infrarroja tiene un elevado potencial para la elucidación de estructuras moleculares. El espectro infrarrojo de una molécula poliatómica está basado en vibraciones moleculares y la energía para producir esas vibraciones depende de la masa relativa de cada parte de la molécula (a mayor masa será necesaria más energía) y de la longitud del enlace. Como consecuencia, el espectro infrarrojo completo de un compuesto orgánico proporciona una huella dactilar única, fácilmente distinguible del patrón de absorción infrarroja de otros compuestos, incluidos los isómeros. Además, la intensidad de la absorción es proporcional a la concentración de la especie absorbente (similar a la ley de Lambert-Beer²¹⁰), por lo que es posible el análisis cuantitativo, que ha aumentado en gran medida durante los últimos años.

La principal ventaja de la espectroscopia infrarroja sobre otras técnicas espectroscópicas, es que prácticamente todos los compuestos interaccionan con la radiación infrarroja, y pueden por ello ser analizados tanto cualitativa como

* En el infrarrojo es frecuente referirse al *número de ondas*: $1/\lambda$ (cm^{-1}), donde λ : longitud de onda (cm).

cuantitativamente. Además, se trata de una técnica rápida, no-destructiva, que no necesita reactivos químicos y no contamina el medio ambiente y que presenta un alto grado de automatización y bajos costes de funcionamiento y mantenimiento, a la vez que ofrece un perfil general de la composición química de la muestra (huella dactilar) con elevada precisión y una detección fiable de los datos. La espectroscopia infrarroja admite medidas in situ y a distancia de prácticamente cualquier muestra, independientemente del estado físico, y con una preparación sencilla.

La introducción de la transformada de Fourier (FTIR) originó una verdadera revolución en la espectroscopia infrarroja, debido a las grandes ventajas que proporciona. La instrumentación moderna de FTIR ofrece muchas posibilidades: 1) el uso de correcciones de absorbancia, calibraciones con múltiples longitudes de onda y la espectroscopia derivativa; que ayudan a evitar los efectos potenciales de interferencia, y 2) la determinación directa de varios componentes en matrices complejas sin preparación de muestra. La espectroscopia FTIR es una técnica analítica rápida que proporciona información cualitativa y cuantitativa valiosa de muestras sólidas, líquidas y gaseosas. No obstante, presenta algunos inconvenientes: 1) el elevado coste de adquisición del equipo, 2) la complejidad de la señal obtenida, que obliga a usar técnicas quimiométricas, 3) la dificultosa preparación del calibrado, 4) la imposibilidad de analizar muestras problema que presenten una variabilidad no contemplada en la calibración, 5) la falta de selectividad, que origina solapamientos y 6) la limitada sensibilidad en comparación con otras alternativas espectroscópicas como la fluorescencia, la absorción molecular ultravioleta-visible etc.

4.2.2. Preparación de muestra

En muchos casos, la preparación de la muestra es innecesaria, por lo que se realiza una inyección directa en el espectrómetro de infrarrojos. En el caso de zumos de frutas y vinos (tanto comerciales como mostos en periodo de fermentación), las partículas sólidas en suspensión se eliminaron mediante centrifugación o filtración^{211,212,213,214,215,216,217,218,219,220}. También se ha descrito la preparación de mosto²¹⁸ y de zumo de manzana²¹⁵ de forma previa al análisis. Otros tratamientos descritos fueron el calentamiento de la miel para derretir los cristales de azúcar²²¹, la degasificación de muestras carbonatadas (bebidas no alcohólicas²²², cerveza²²³ y vinos carbonatados²¹⁹) y la dilución de bebidas espirituosas²²³ (para la determinación de etanol). Vonach, R. et al.²²² y LeThanh, H. et al.²²⁴ recurrieron a la estabilización de zumos de frutas y bebidas no alcohólicas con azida sódica para prevenir efectos mutarrotacionales en el espectro infrarrojo de glucosa y fructosa (etapa posterior a la degasificación).

Para la determinación de los componentes mayoritarios, se prepararon extractos secos al vacío y extractos bencénicos evaporados de una serie de brandies españoles y de coñacs franceses²²⁵. Los extractos al vacío se prepararon a partir de muestras evaporadas a sequedad sobre cloruro cálcico y ácido sulfúrico en un desecador a vacío, mientras que los extractos bencénicos evaporados se obtuvieron por agitación a 30 °C (durante 2-4 días), posterior secado de la fase bencénica con cloruro sódico y eliminación del benceno por evaporación.

4.2.3. Instrumentación

Desde la conocida técnica de los comprimidos de bromuro potásico, empleada por Bellanato, J. et al²²⁵ en el año 1988 para analizar extractos de brandies y coñacs, la espectroscopia infrarroja se ha revitalizado con una nueva generación de instrumentos. El acoplamiento entre la espectroscopia infrarroja de transformada de Fourier, y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) posee un gran interés en química analítica y se ha desarrollado mucho en los últimos años^{216,217,220,222}. La mayoría de los compuestos presenta absorción en la región infrarroja, por tanto, la espectroscopia FTIR, acoplada con la cromatografía líquida, proporciona información detallada tipo huella dactilar sobre los analitos una vez separados. En este sentido, Edelmann, A. et al.²²⁰ han aplicado por primera vez un láser de cascada cuántica como fuente muy potente de luz para la detección en el infrarrojo medio (MIR) en cromatografía líquida de alta eficacia. La emisión del láser a 1067 cm⁻¹ maximiza la absorción de glucosa y fructosa, lo que permitió realizar una detección específica de grupo.

También se han descrito acoplamientos entre la espectroscopia FTIR y el análisis de inyección de flujo²²⁶ o los dispositivos de inyección secuencial^{224,227}, que ofrecen importantes ventajas, ya que combinan la posibilidad de un manejo reproducible y automático de líquidos con la obtención de información molecular específica. El acoplamiento del análisis de flujo con la espectroscopia infrarroja tiene como principal limitación la opacidad de las fases móviles acuosas, ya que el agua presenta bandas importantes en el infrarrojo. Para solucionar esta interferencia, se han investigado distintos dispositivos para la eliminación del disolvente, como la generación de una fase vapor^{228,229} o la extracción con disolventes clorados²²⁶. Otra alternativa a la eliminación del disolvente es la utilización de una celda de flujo como interfase: la celda es una construcción tipo sándwich formada por dos ventanas transparentes al infrarrojo y un polímero epoxi, que proporciona una longitud corta de camino óptico, generalmente entre 10 y 200 μm²¹⁶. Si se necesitan caminos ópticos de 20 μm o menos, también ha sido descrito el uso de celdas de reflectancia interna²³⁰.

La elección del material para las ventanas de infrarrojos está principalmente determinada por las propiedades de la fase móvil, el disolvente y la región espectral en la que se va a realizar la medida. Los materiales más frecuentemente usados en la literatura para las ventanas de infrarrojos (celdas de líquidos) son el fluoruro de calcio^{212,216,222,224,231}, el cuarzo^{221,232,233,234,235,236} y el vidrio^{213,223,226}. También se ha descrito una celda de líquidos formada por una ventana de fluoruro de calcio y otra de seleniuro de zinc²²⁷, así como una celda de gases de seleniuro de zinc^{228,229}. Para compatibilizar la fase móvil ácida (ácido sulfúrico 0,005M), necesaria para la separación por cromatografía de intercambio iónico, con las ventanas de fluoruro de calcio transparentes al infrarrojo de la celda de flujo, se ha descrito un procedimiento para cubrir las ventanas con una película protectora de polietileno de baja densidad, que evita la degradación ácida de dichas ventanas²¹⁶. El problema de la fase móvil ácida también puede solucionarse empleando materiales de ventana más resistentes, como es el caso del diamante, que se ha ensayado con éxito en una celda de flujo de reflectancia total atenuada horizontal, utilizando una fase móvil ácida para la separación previa por cromatografía de intercambio iónico²¹⁷.

Además de las celdas de transmisión usadas habitualmente, también se han descrito celdas de seleniuro de zinc para reflectancia total atenuada^{215,218,237,238} y microatenuada²³⁹. Reid, et al.²³⁶ utilizan un cristal de germanio para reflectancia total atenuada. Garrigues, S. et al.²³⁰ realizaron un estudio comparativo entre dos geometrías de celdas de reflectancia interna (horizontal y cilíndrica). Los resultados obtenidos con ambas geometrías fueron aceptables, no obstante la celda horizontal de reflectancia total atenuada proporcionó una mayor sensibilidad analítica. También se ha utilizado la reflectancia difusa²⁴⁰. A partir de la comparación entre las medidas de transreflectancia, transmitancia y reflectancia difusa, se concluyó que los modelos generados a partir de los espectros de transmitancia proporcionaron los mejores resultados²¹⁴. Qiu, P.Y. et al.²²¹ también observaron una mejor resolución en los espectros de transmitancia con respecto a los de reflectancia, que generaron peores modelos de regresión.

Se ha observado un aumento significativo de la relación señal/ruido en las medidas FTIR en la región investigada ($1600\text{--}900\text{ cm}^{-1}$) utilizando filtros ópticos^{216,222}. Mediante estos filtros, aumenta la intensidad de la radiación en la región de interés y mejora el límite de detección. Otra opción en la instrumentación del infrarrojo la ofrece la espectroscopia de transmisión de infrarrojo cercano de onda corta está alcanzando mucha popularidad²³³. Esta región espectral, comprendida entre $700\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$, tiene la ventaja de que permite el uso de espectrómetros comunes de diodos alineados para el visible, lo que reduce el tiempo y el coste en comparación con los instrumentos tradicionales de espectroscopia NIR y MIR. En esta región, el espectro vibracional está muy afectado por la temperatura, por lo que es necesaria una corrección de la temperatura en los espectros (en el siguiente apartado: *tratamiento de los datos*).

Para evitar el efecto interferente de la matriz de la muestra, debido principalmente a los azúcares, se han empleado varias estrategias en la determinación de etanol (y metanol) en bebidas alcohólicas. Se ha descrito un método de análisis cuantitativo basado en la generación de una fase vapor a partir de una muestra líquida, que es inyectada de forma directa, a través de un septum, en un reactor de vidrio calentado, donde es volatilizada y transportada, mediante una corriente de nitrógeno, a la celda de gases del espectrómetro de infrarrojos^{228,229}. Tipparat, P. et al.²²⁶ optaron por un proceso de extracción líquido-líquido del etanol presente en bebidas alcohólicas, basado en un equilibrio *off-line* de la muestra con cloroformo seco para transferir el etanol a la fase orgánica (en muestras coloreadas, se añadió cloruro sódico para romper la emulsión), que es inyectada en una corriente de cloroformo seco y transportada a la celda de flujo, donde se obtiene su espectro infrarrojo. La interferencia de los azúcares también puede corregirse, sin eliminar la matriz, realizando las medidas a dos longitudes distintas de camino óptico y resolviendo el sistema de ecuaciones de dos incógnitas²²³.

4.2.4. Tratamiento de los datos

La estadística multivariante proporciona herramientas quimiométricas, como el análisis de componentes principales o la regresión por mínimos cuadrados parciales, capaces de establecer relaciones entre un elevado número de variables dependientes con variaciones extremadamente complejas (como los espectros de infrarrojo) y variables independientes (como las concentraciones). Hoy en día, el desarrollo de la informática nos permite procesar los datos de forma rápida y precisa para obtener esta información.

De forma previa al tratamiento estadístico de los datos, suele realizarse un pre-tratamiento de los mismos, encaminado a purificar el espectro y eliminar errores del sistema. Entre los métodos descritos para el pre-tratamiento de los datos espectrales, se encuentra la selección del rango (o rangos) de números de onda a incluir en el tratamiento estadístico^{212,213,214,222,224,227,228,230,231,238,239,241,242,243,244,245}, que incluirá regiones características donde absorban los compuestos de interés así como otros constituyentes de la matriz y excluirá aquellas zonas con excesivo ruido (por ejemplo, debido a la absorción del agua). El empleo de algoritmos genéticos (basados en la idea de la evolución por selección natural introducida por Darwin en 1857) para la obtención de los rangos espectrales útiles ha dado buenos resultados^{215,218,237}. El análisis de componentes principales (PCA) se ha utilizado para la reducción del número de variables que muestran colinealidad, de forma que las muestras se representan en un nuevo espacio de dimensiones reducidas^{236,246}. Varios autores

utilizan el PCA para la detección de outliers^{240,246,247}. En algunos casos, se ha descrito el cálculo de la derivada primera^{213,217,221,223,224,235,236,240,242,247} o segunda^{214,234} del espectro para evitar variaciones en la línea base y errores relacionados con la presencia de partículas sólidas. Cuando los datos de la primera o segunda derivada no suponen una mejora, se emplean los datos espectrales originales²⁴¹. Otros pre-tratamientos encontrados en la literatura fueron los métodos de centrado de la media^{212,214,224,227,236,239,246,248}, escalado de la varianza²⁴⁸, auto-línea base²³⁹, estandarización del espectro^{213,214}, suavizado^{246,247}, etc.

En relación al tratamiento estadístico, la regresión de mínimos cuadrados parciales es una técnica de calibración multivariante ampliamente utilizada para el tratamiento de datos espectrales, con un gran poder de predicción en muestras desconocidas. Los ensayos de calibración realizados con diferentes modelos de regresión mostraron que los mínimos cuadrados parciales (PLS)^{211,212,213,214,219,221,224,227,230,231,234,238,239,240,241,242,243,244,248,245,246,247} proporcionaron mejores resultados que la regresión lineal múltiple (MLR)^{221,242,248} o la regresión de componentes principales (PCR)^{221,239,248}. Esto podría explicarse teniendo en cuenta que la calibración MLR sólo utiliza números de onda seleccionados, mientras que la PCR captura toda la variación posible en el rango espectral completo. Sin embargo, tanto MLR como PCR no tienen en cuenta los valores de referencia cuando seleccionan o construyen los componentes espectrales, mientras que en el modelo de regresión PLS la información sobre los valores de referencia está implicada en la construcción de los componentes espectrales²⁴⁹. Comparaciones posteriores demostraron que los mínimos cuadrados parciales modificados funcionaron mejor que la calibración PLS²²¹. La calibración PLS proporcionó resultados ligeramente mejores que la regresión stepwise²⁴⁸ y el método de las ecuaciones proporcionales²²⁸, mientras que la transformada *wavelet*²³² ofreció una mayor precisión en la predicción.

En cuanto a las técnicas de clasificación, se han empleado redes neuronales artificiales²¹⁵, funciones potenciales²¹⁵, modelado suave independiente de analogía de clase^{212,215,235} (SIMCA), análisis de componentes principales^{212,235,236,241}, análisis lineal discriminante^{236,241}, adaptaciones de la regresión por mínimos cuadrados parciales^{215,218} y fusión de datos de alto nivel^{218,237} (combinación de las señales de diferentes sensores).

4.2.5. Aplicaciones

En el control de procesos y el análisis de rutina se necesitan técnicas analíticas fiables que permitan realizar un seguimiento de los procesos. Los principales requisitos de estas técnicas son la rapidez, el alto grado de automatización y el bajo coste. Los análisis espectroscópicos directos son apropiados en este contexto, sobre todo porque las medidas pueden realizarse *on-line* o *in-line*, con escasa preparación de muestra y escaso consumo de reactivos. En el campo de los alimentos y las bebidas, la aplicación de las técnicas espectroscópicas en el estudio del origen (autenticidad), diferenciación y control de procesos se ha desarrollado considerablemente en los últimos años.

En relación a la adulteración de alimentos y bebidas, la determinación rápida de azúcares mayoritarios en miel^{221,239} podría utilizarse para detectar la adición de edulcorantes baratos a la miel de abeja. En zumos de frutas, la espectroscopia infrarroja va encaminada a evaluar la calidad y detectar la adulteración o contaminación. En este sentido, se ha empleado para cuantificar azúcares^{213,214,222,224,230} y para clasificar las bebidas de manzana en función de la cantidad de zumo de manzana que contienen²¹⁵. Pontes, M.J.C. et al.²³⁵ han usado la espectroscopia infrarroja para verificar la adulteración de bebidas alcohólicas destiladas (whiskey, brandy, ron y coñac), consiguiendo una clasificación del 100 % entre bebidas adulteradas y no adulteradas. Esta técnica tiene potenciales aplicaciones en el control de calidad, como método rápido para detectar bebidas adulteradas, que posteriormente se someterían a un análisis cromatográfico más profundo.

El control analítico del etanol es importante en bebidas alcohólicas por razones de salud y económicas (debido a las tasas especiales impuestas al alcohol). En el caso del metanol, la elevada toxicidad que conlleva su ingestión, inhalación o absorción cutánea, hace necesario su control exhaustivo en las bebidas. Esto explica la importancia de la determinación de etanol y metanol en bebidas alcohólicas^{211,216,217,219,223,226,227,228,229,231,233,242,244}. Con el objetivo de acercar la espectroscopia infrarroja a la química analítica de procesos, Van den Berg, F.W.J. et al.²³⁴ han realizado un estudio sobre la determinación de etanol durante la producción de bebidas alcohólicas, lo que podría aplicarse al seguimiento de la producción.

La espectroscopia infrarroja tiene importantes aplicaciones en el terreno del vino y sus derivados. Con un tiempo muy reducido de análisis, es posible obtener información de la composición química del producto, lo que posibilita el seguimiento de los cambios en la composición química desde el comienzo de la maduración de la uva, a través del mosto y la fermentación, hasta el vino terminado. También es posible obtener una huella dactilar de los productos, que resulta útil para controlar la producción y la calidad final del vino (control de calidad). El infrarrojo se ha utilizado

para el seguimiento completo de una fermentación²¹¹ (lo que podría evitar los efectos negativos de las fermentaciones lentas en la productividad y la calidad del vino) y para la diferenciación entre las escalas de envejecimiento del vino²⁴¹. La determinación simultánea de alcoholes y azúcares (además de otros compuestos de interés) en vino es una prueba de la gran cantidad de información química proporcionada por un espectro de infrarrojos^{216,217,219,227,231,248}. Las principales fuentes de variación encontradas en los espectros de infrarrojos de distintos tipos de vinos fueron el contenido en azúcares reductores y alcohol, así como la etapa de fermentación y el periodo de maduración de los vinos²¹².

Cozzolino, D. et al.²⁴⁷ han estudiado la relación entre el análisis sensorial y la espectroscopia infrarroja en vinos blancos. Los autores concluyen que existe cierta relación entre ambos parámetros, aunque no es posible identificar los compuestos químicos que toman parte en estas relaciones. En un trabajo posterior, utilizan la combinación de los resultados procedentes de la nariz electrónica y del espectro infrarrojo para medir atributos sensoriales en vinos blancos²⁴⁶. Los resultados obtenidos revelan que la combinación de diferentes técnicas analíticas instrumentales mediante tratamientos quimiométricas presente numerosas ventajas y podría ser utilizada para la estimación rápida de atributos sensoriales específicos en determinados vinos. Este trabajo se considera un punto de partida que podría aplicarse a diferentes variedades de vinos y a otras bebidas.

El elevado potencial de la espectroscopia infrarroja en el análisis de bebidas alcohólicas ya fue vislumbrado por Bellanato, J. et al.²²⁵ en el año 1988 a partir del análisis de extractos de brandies y coñacs, cuyos espectros revelaron diferencias cualitativas y cuantitativas apreciables en la composición que se relacionaron, en una primera aproximación, con su cotización en el mercado. En un trabajo más reciente, se ha ensayado la espectroscopia infrarroja para la clasificación de brandies comerciales en las categorías Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva, consiguiéndose únicamente la separación de los grupos Solera y Solera Gran Reserva ya que los brandies Solera Reserva se localizaron entre ambos grupos. En el mismo trabajo, los brandies de distintos orígenes presentaron claras diferencias frente a coñacs y armañacs²⁴¹. La clasificación de mostos de uva blanca en función de la variedad de uva, realizada a partir de espectros infrarrojos combinados con las señales de otros detectores, tiene importantes aplicaciones para garantizar la autenticidad de la variedad de uva^{218,237}. En un trabajo posterior, Reid, L.M. et al.²³⁶ utilizan únicamente la espectroscopia infrarroja para clasificar los zumos de manzana en función de la variedad de manzana y el tratamiento térmico realizado.

La predicción de azúcares reductores en vinagre, mejorada por Fu, X. et al.²³², ha sido aplicada *on-line* como método analítico rápido a escala industrial. También se han determinado azúcares durante la producción de bebidas alcohólicas²³⁴. Varios autores han estudiado la capacidad del espectro infrarrojo para la determinación de parámetros enológicos. Esta información multiparamétrica, que tiene potenciales aplicaciones en el seguimiento de los procesos y el control de calidad, se ha estudiado en sidras (acidez volátil y total, pH, fructosa, etc.)²⁴⁵, vinos (etanol, acidez total, pH, color, índice de polifenoles totales, etc.)²⁴⁰ y cerveza (contenido en alcohol, etc.)²³⁸.

4.3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES

En este apartado de los antecedentes se ha recopilado la bibliografía relacionada con el análisis mediante cromatografía de gases de bebidas y algunas frutas durante los últimos años (uva, pera, zumos de frutas, zumo de tomate, cerveza, vino y bebidas alcohólicas destiladas).

4.3.1. Introducción

El término “olor” hace referencia a los efectos biológicos, físicos y psicológicos causados por la interacción entre estimulantes químicos (aromas y fragancias) y los sistemas olfativos de los organismos vivos. El estudio de la composición de los aromas es muy relevante en varios campos, entre ellos el sector alimentario. En química de alimentos, los compuestos químicos o sus mezclas asociadas con olores percibidos como agradables están relacionados con un conjunto de respuestas sensoriales conocido como *flavour* o *flavor*, y que consiste en una combinación del sentido del gusto y del olfato. El *flavour* es un elemento predominante en la percepción de la calidad de alimentos y bebidas y, por tanto, en su aceptación por parte de los consumidores. Los *off-flavours*, que son sustancias volátiles con olores desagradables, pueden estar causados por contaminación microbiológica de los alimentos o bebidas, siendo por ello importantes en la investigación sobre la calidad de los alimentos.

Los aromas son percibidos por los seres vivos como una sensación global, mientras que la mayoría de los análisis químicos miden los compuestos del aroma individualmente, de forma cualitativa y cuantitativa. De esta forma, las sensaciones percibidas pueden separarse en elementos claramente definidos: los compuestos químicos. Sin embargo, el desarrollo y aplicación de metodologías para la determinación de la composición química de los aromas es una tarea difícil debido a ciertas propiedades inherentes a algunos tipos de muestras:

- Las concentraciones de determinados compuestos en los aromas pueden ser extremadamente bajas. En este sentido, las concentraciones típicas perceptibles para algunos compuestos del aroma pueden ser menores de 1 ng/L. Como consecuencia de ello, los procedimientos analíticos empleados deben proporcionar sensibilidades extremadamente altas, adecuadas para la detección y cuantificación de estos compuestos a niveles tan bajos.

- Aparte de las bajas concentraciones características de estos compuestos, muchos aromas son mezclas extremadamente complejas de sustancias. Este es el caso de las bebidas alcohólicas destiladas (objeto de estudio en este capítulo), que constituyen una mezcla formada por cientos de compuestos individuales, pertenecientes a distintas familias químicas (alcoholes, ésteres, ácidos carboxílicos, cetonas, aldehídos, etc.), que contribuyen al aroma.

Como consecuencia de estos dos factores, la caracterización química de los aromas necesita técnicas avanzadas para el muestreo y preparación de la muestra, separación de analitos, detección y cuantificación. Generalmente se utiliza una técnica analítica de separación en las últimas etapas. La cromatografía de gases proporciona una elevada eficacia y una excelente sensibilidad. Esta técnica, acoplada a la espectrometría de masas (GC-MS) y otros sistemas de detección similares, como el detector de ionización de llama (FID), son las herramientas habitualmente empleadas en el análisis químico de los aromas. El acoplamiento de la detección olfatométrica a la cromatografía de gases (GC-O) constituye también una herramienta importante para el análisis químico de aromas. El adecuado aislamiento y preconcentración de los analitos responsables del aroma son etapas críticas en una metodología para la caracterización química de aromas. Para ello se han empleado distintos dispositivos de extracción (discutidos en el siguiente epígrafe), como la extracción líquido-líquido clásica, la extracción en fase sólida (SPE), la microextracción en fase sólida (SPME) y el muestreo del espacio de cabeza dinámico y estático.

Junto a las técnicas cromatográficas, el uso de la “nariz electrónica” ha crecido en los últimos años. La nariz electrónica presenta como ventajas la posibilidad de una evaluación cualitativa y cuantitativa rápida y directa, con una escasa o nula preparación de muestra. Sin embargo, las bajas sensibilidades proporcionadas deben tenerse en cuenta a la hora de enfrentarse a la caracterización de aromas.

4.3.2. Preparación de muestra

Una adecuada elección de la técnica de preparación de muestra es esencial para obtener unos resultados exactos y fiables, sobre todo en el estudio de la composición volátil, donde se trabaja con muestras complejas de analitos a muy bajas concentraciones. La preparación de la muestra y la extracción de compuestos volátiles son etapas críticas en la mayoría de análisis de compuestos volátiles. Estas etapas pueden servir para concentrar los compuestos volátiles, eliminar las impurezas y aislar las fracciones específicas de interés. En este apartado se ha estudiado de forma

conjunta la determinación de compuestos volátiles en distintos tipos de bebidas, sobre todo en bebidas alcohólicas destiladas, vino, cerveza y zumos de frutas.

La destilación es un procedimiento tradicional para el aislamiento de compuestos volátiles. Un método de preparación de muestra basado en la destilación es la extracción-destilación simultánea, utilizado por Kahle, K. et al.²⁵⁰ para la concentración de los compuestos volátiles de la pera. La extracción líquido-líquido también se ha empleado tradicionalmente para aislar y concentrar los analitos de forma previa al análisis mediante cromatografía de gases. Entre los disolventes utilizados está el diclorometano^{251,252,253,254,255,256,257,316,258}, isooctano^{312,251}, pentano^{259,260,312}, triclorofluorometano^{67,261,262} (freón 11), mezclas de pentano:diclorometano^{263,264,265,266}, pentano:diel éter^{267,268} y hexano:diel éter^{317,318}. En brandies envejecidos²⁵² y vinos tintos²⁵⁵ se ha utilizado la extracción líquido-líquido asistida por ultrasonidos. Lau, M.N. et al.²⁶⁹ utilizan la extracción con cloroformo como etapa final en la preparación de la muestra para extraer derivados de tiazolidina, originados en un proceso de derivatización que implica la reacción de los aldehídos de interés con cisteamina (2-aminoetanotiol). Sin embargo, la extracción líquido-líquido en general presenta algunos inconvenientes como el consumo de grandes cantidades de disolvente orgánico, el riesgo que supone la manipulación de dichos disolventes, tanto para el usuario como para el medio ambiente, y el gasto de tiempo.

En los últimos años, la investigación se ha orientado hacia el desarrollo de métodos miniaturizados de preparación de muestra, como la microextracción líquido-líquido, que consiste en una extracción líquido-líquido convencional que se realiza con proporciones muestra:disolvente superiores a 100¹². Comparada con la extracción convencional, la microextracción necesita menos volumen de disolvente orgánico, con lo que resulta menos contaminante, más barata y consigue una mayor concentración en la fase orgánica, por ello no necesita etapa de concentración. Para la microextracción líquido-líquido se ha usado como disolvente el 1,1,2-tricloro-1,2,2-trifluoroetano^{69,270,271} (freón 113). La extracción con fluidos supercríticos (SFE) también presenta importantes ventajas para el fraccionamiento de bebidas debido a la selectividad en las variables del proceso, el uso de disolventes no tóxicos y la capacidad para producir extractos aromáticos de gran calidad en poco tiempo. Señoráns, F.J. et al.²⁷² han optimizado las condiciones de la extracción con fluidos supercríticos en contracorriente para la obtención de extractos de brandy de alta calidad (a escala de planta piloto). Blanch, G.P. et al.²⁷³ han evaluado la aplicabilidad de SFE-GC *on-line* para el análisis del aroma del vino utilizando PTV como interfase para recoger los analitos. Sin embargo el método dio muchos problemas, que fueron solucionados mediante la extracción y recolección *off-line* con SFE-PTV.

La extracción en fase sólida (SPE) se puede aplicar directamente al aislamiento de compuestos volátiles en muestras líquidas, como las bebidas y la pulpa de la fruta. En la bibliografía se ha utilizado la extracción en fase sólida con muestras variadas: bebidas alcohólicas destiladas^{44,45,274,275} (entre ellas el brandy), bebidas alcohólicas de color rojo²⁷⁶ (vino tinto^{277, 278} y varios licores de frutas), destilados de orujo²⁷⁹, vino^{280,281,282} y zumo de naranja²⁸³. Debido a la elevada solubilidad de los ácidos orgánicos y compuestos fenólicos en la matriz de la muestra, la separación no puede realizarse con técnicas de partición, como la extracción líquido-líquido convencional. Por ello, algunos autores recurrieron a la extracción en fase sólida basada en un disco con un fuerte intercambiador de aniones^{44,284}. Para adaptar los analitos a una técnica en fase vapor, éstos fueron posteriormente derivatizados (sililación^{44,45} en bebidas alcohólicas destiladas y esterificación en vino²⁸⁴) y el extracto fue inyectado directamente en el cromatógrafo de gases. Comparada con el formato de cartucho, la SPE en formato de disco es más rápida y reproducible.

Para la identificación de compuestos carbonílicos a nivel de trazas en coñac y calvados, se ha descrito un proceso específico de extracción con el reactivo T de Girard soportado en sílica gel²⁵⁷. Este reactivo, que ha sido utilizado anteriormente para el aislamiento de numerosos compuestos naturales, participa en una reacción con aldehídos y cetonas para producir las correspondientes hidrazonas. Esta reacción tiene lugar cuando se ponen en contacto el reactivo T de Girard soportado en sílica gel y la fase orgánica resultante de la extracción líquido-líquido del coñac/calvados con tolueno o pentano, produciéndose la condensación de los compuestos carbonílicos en la fase sólida. Posteriormente, se aísla la fase sólida y se recuperan los compuestos carbonílicos mediante hidrólisis. Este método ha demostrado ser muy específico para compuestos carbonílicos, y ha permitido la identificación de numerosos aldehídos y cetonas alifáticos, además de algunos compuestos carbonílicos azufrados. Ledauphin, J. et al.²⁸⁵ utilizan la derivatización con la hidrazona 3-metilbenzotiazolin-2-ona para la cuantificación de aldehídos aromáticos en calvados y coñac. Comparada con otros métodos, esta reacción de derivatización de compuestos carbonílicos puede realizarse a temperatura ambiente, evitándose la reacción indeseable de acetalización, que puede ocurrir en exceso de etanol.

La forma más sencilla de estudiar la composición química de un aroma es el análisis directo de una porción del aire en contacto con la muestra, sin ninguna otra etapa de pre-tratamiento. Esta técnica se denomina muestreo del espacio de cabeza estático y se ha empleado en brandies^{286,287}, coñacs^{51,286} y whiskeys irlandeses²⁸⁸. El principal inconveniente del muestreo del espacio de cabeza estático es una sensibilidad

limitada frente a las técnicas dinámicas como la “purga y trampa”^{*} y la microextracción en fase sólida (discutida a continuación). Una alternativa al muestreo del espacio de cabeza lo constituye la *hipervaporización analítica*, ampliamente utilizada en la industria, cuya aplicabilidad al aislamiento cuantitativo de compuestos volátiles en zumo de naranja ha sido evaluada con éxito por Gómez-Ariza, J.L. et al.²⁸⁹.

La reciente introducción de la microextracción en fase sólida (SPME) ha permitido una etapa de preparación de muestra más sencilla y rápida, ya que permite realizar simultáneamente las etapas de extracción y concentración. Esta técnica tiene un elevado poder de concentración, no utiliza disolvente orgánico, es ecológica, fiable y fácil de automatizar. En la SPME, una fibra de sílice fundida cubierta con una fase estacionaria polimérica es introducida directamente en la muestra líquida (SPME de inmersión directa) o en el espacio de cabeza sobre ella (SPME de espacio de cabeza), posteriormente la fibra es extraída de la muestra e introducida en el cromatógrafo de gases para la desorción de los analitos volátiles. Generalmente, la SPME de espacio de cabeza (HS-SPME) es más adecuada que la SPME de inmersión directa (DI-SPME) para aislar los compuestos volátiles, ya que permite tiempos de extracción más cortos, alarga la vida de la fibra y evita la extracción de compuestos no volátiles que puedan resultar interferentes.

La HS-SPME se ha utilizado para el análisis de compuestos volátiles en bebidas alcohólicas destiladas (brandy²⁶¹, whisky^{290,291}, ron²⁹², coñac^{42,293}, tequila²⁹⁴, vodka²⁹⁵, cachaça²⁹⁶, destilado de naranja^{297,298}), vino^{277,282,299,300,301,302}, vinagre^{303,304}, cerveza³⁰⁵ y zumos de frutas³⁰⁶. Para la determinación de compuestos carbonílicos C₁-C₆ en bebidas alcohólicas y destilados, Wardencki, W. et al.²⁹⁵ recurrieron al muestreo HS-SPME de las oximas formadas en la derivatización con *O*-(2,3,4,5,6-pentafluorobencil)hidroxilamina (PFBHA) en soluciones alcohólicas, de forma previa a su determinación por GC. Castro, R. et al.²⁶⁸ han comparado la capacidad de la HS-SPME y la extracción líquido-líquido rotatoria y continua para la determinación de compuestos volátiles en vino fino. A pesar de que ambos métodos fueron adecuados y sensibles, la SPME presentó una mayor sensibilidad que la extracción líquido-líquido para varios compuestos. A su vez, la extracción líquido-líquido ofrece la posibilidad de la extracción simultánea de varias muestras. Sin embargo, la SPME presenta mayores ventajas, ya que no necesita disolvente, utiliza volúmenes de muestra menores y presenta una mayor sensibilidad y simplicidad.

Recientemente, ha aparecido una variante de la SPME: *stir-bar sorptive extraction* (SBSE), cuya traducción sería “extracción de barra por desorción térmica”.

* El gas portador fluye a través de la muestra y los analitos volátiles son atrapados y posteriormente desorbidos en el cromatógrafo de gases.

El fundamento de esta nueva técnica, conocida como *twister*, es similar al de SPME con la excepción de que utiliza una barra de agitación magnética cubierta con una capa de polidimetilsiloxano (PDMS) en lugar de la fibra de SPME. Las ventajas de SBSE son el uso de una cantidad de fase más de 100 veces mayor, que conduce a un aumento considerable de la sensibilidad sobre SPME. Por ello, mientras que SPME es apropiada para el análisis de rutina y la detección de compuestos volátiles mayoritarios, SBSE es más sensible y puede ser utilizada para el análisis de trazas y ultratrazas. Sin embargo, una desventaja de la SBSE es que, en la actualidad, la barra de agitación magnética presente una capacidad de enriquecimiento limitada para los compuestos polares, ya que sólo está disponible con recubrimiento de PDMS. SBSE ha sido utilizada para la determinación de compuestos volátiles en uvas³⁰⁷, vinos^{301,308,309}, vinagres³¹⁰ y whiskies²⁹¹. En éste último trabajo sobre whisky, se realiza una comparación entre SPME y SBSE, concluyéndose que SBSE, como técnica más sensible, resulta más apropiada para el análisis de trazas y ultratrazas, mientras que SPME sería aplicable al análisis de rutina y a la detección de compuestos presentes a concentraciones mayores.

Ferreira, V. et al.³¹¹ han estudiado la capacidad de la cromatografía líquida de alta eficacia en fase inversa (RP-HPLC) para el fraccionamiento semi-preparativo de los extractos del aroma de vinos y bebidas alcohólicas destiladas (brandy y whisky). Los extractos de dietil éter-pentano, diclorometano y freón 11, obtenidos mediante extracción líquido-líquido y posterior concentración, fueron fraccionados por RP-HPLC semi-preparativa. Las fracciones eluidas fueron sometidas a re-extracción con diclorometano y, finalmente, estos extractos se inyectaron en el cromatógrafo de gases. Una de las principales ventajas de éste método, que ha demostrado ser robusto y reproducible, es que utiliza disolventes no tóxicos, por lo que las fracciones aisladas pueden ser utilizadas para análisis sensorial (también utilizada en este artículo). Sin embargo, presenta como inconveniente la necesidad de re-extracción de los compuestos del aroma.

En este punto de la discusión, es preciso tener en cuenta que las bebidas alcohólicas destiladas presentan una matriz diferente del resto de bebidas. A pesar de que difieren en el grado alcohólico, los destilados presentan una matriz hidro-alcohólica relativamente limpia, mientras que el vino y la cerveza contienen un amplio rango de compuestos no volátiles, presentes a elevadas concentraciones, como proteínas, azúcares no fermentables, pectinas, etc. Por ello, la inyección directa de bebidas alcohólicas destiladas podría ser una buena opción para reducir el tiempo de análisis. En la bibliografía se ha descrito el análisis mediante inyección directa sobre todo para compuestos volátiles mayoritarios (previa dilución en algunos casos y adición del estándar interno) en coñac³¹², brandy de Jerez²⁹, whisky^{67,313}, brandy de sidra^{69,314}, destilado de naranja²⁹⁷, destilados de orujo³¹⁵, destilados griegos (*Tsipouro*³¹⁶, *Mouro*³¹⁷ y *Koumaro*³¹⁸), destilados de melón³¹⁹, licor medicinal chino y

otros destilados³²⁰, aunque también se ha empleado la inyección directa con vino³²¹, cerveza³²⁰, zumos de frutas, vinagre, leche y otras bebidas³²².

A pesar de que la inyección directa de bebidas alcohólicas destiladas resulta factible, también presenta algunos inconvenientes como la necesidad de un mantenimiento frecuente del equipo, en vista de los problemas potenciales derivados de inyecciones repetidas, como la contaminación del *liner* por compuestos no volátiles. MacNamara, K. et al.³²³ utilizaron un dispositivo novedoso para la inyección directa de whisky en el que el disolvente se separa *on-line* de los analitos en un inyector de temperatura programable (PTV). Como resultado, se obtuvieron picos cromatográficos con una forma adecuada y una buena resolución para los ácidos grasos y ésteres estudiados. Villén, J. et al.³²¹ proponen un método de inyección directa para el análisis de vino mediante cromatografía de gases basado en un inyector PTV que no necesita preparación de muestra. El procedimiento no utiliza disolvente y no es caro, ya que no precisa de una metodología especial. Este método es comparado con otras técnicas de aislamiento que implican la extracción continua líquido-líquido y la extracción-destilación simultánea, resultando la inyección directa el método más adecuado si se tiene en cuenta que proporciona una información completa en poco tiempo (2 horas aproximadamente) a partir de una pequeña cantidad de muestra y sin necesidad de ningún tipo de pre-tratamiento.

4.3.3. Instrumentación

La cromatografía de gases, que proporciona una gran eficacia y una excelente sensibilidad, es una de las técnicas analíticas modernas más importantes para el análisis de compuestos volátiles. A diferencia de la mayor parte de técnicas cromatográficas, la fase móvil (generalmente He, aunque también otros gases como N₂, etc.) no interacciona con las moléculas del analito: su única función es la de transportarlo a través de la columna. Por tanto, la separación se basa principalmente en la interacción del analito con la fase estacionaria. Uno de los factores clave en el éxito de la GC ha sido la evolución de las columnas utilizadas. Aunque la GC comenzó con columnas empaquetadas (la fase estacionaria está constituida por partículas empaquetadas dentro de la columna), actualmente los métodos más extendidos son los que utilizan columnas capilares (las paredes interiores del tubo capilar suelen estar recubiertas de una película de fase estacionaria líquida), que presentan una mayor resolución y eficiencia cromatográfica. Entre las columnas capilares, las más utilizadas son las de sílice fundida. Estas columnas son fabricadas a partir de sílice de alta pureza y recubiertas con un polímero que le proporciona una elevada resistencia mecánica en comparación con las primeras columnas capilares, hechas de metal o vidrio.

Las columnas capilares descritas en la bibliografía sobre el análisis de compuestos volátiles se detallan en la *tabla II*. Las fases estacionarias líquidas más estables y más utilizadas están basadas en un esqueleto de polisiloxano, donde la sustitución del polímero proporciona la combinación deseada de polaridad y selectividad. El segundo tipo de polímeros que ha encontrado múltiples aplicaciones ha sido el polietilenglicol (PEG), que proporciona una elevada selectividad. Las columnas *PLOT* (*Porous Layer Open Tubular*: columnas abiertas de pared porosa) mencionadas en la *tabla II*, o columnas de adsorción, están cubiertas con adsorbentes (actúan como fase estacionaria), que suelen ser polímeros porosos o tamices moleculares. Por tanto, en las columnas *PLOT* se habla de cromatografía gas-sólido, que se basa en la adsorción de sustancias gaseosas sobre superficies sólidas (frente a la cromatografía gas-líquido, usada habitualmente, que emplea fases estacionarias líquidas). Volviendo a la cromatografía gas-líquido, en la *tabla II* se hace referencia a las columnas *FFAP*, en las que la derivatización con el ácido nitrotereftálico produce una fase esterificada (*FFAP*: *free fatty acid phase*). El PEG derivatizado es muy estable y puede ser usado para analizar ácidos grasos libres.

Frente al elevado número de trabajos en los que se utilizan columnas capilares, sólo hay cinco artículos relativamente recientes que emplean columnas empaquetadas, siempre en combinación con el detector de ionización de llama (FID): Mangas, J. et al.³¹⁴ y Rodríguez, R. et al.⁶⁹ utilizaron columnas empaquetadas de acero inoxidable de *Carbowax 1500* (polietilenglicol) depositado sobre *Carbopack C* (adsorbente de carbono negro grafitizado), Aylott, R.I. et al.⁶⁷ emplearon una columna *Carbowax 20M* (polietilenglicol) depositado sobre *Carbopack B* (adsorbente de carbono negro grafitizado), mientras que Soufleros, E.H. et al.^{317,318} emplearon una columna de *Carbowax 400* + *Hallcomid M-18-OL* (polietilenglicol + octadecen-9-amida) depositado sobre *Chromosorb W* (basado en tierra de diatomeas).

COLUMNA ^{referencia}	FASE ESTACIONARIA
<i>CP-Wax</i> ^{29,312,279,313,315,317,318,320,322,251,259,275,290,299}	polientilenglicol
<i>DB-Wax</i> ^{67,316,251,252,253,256,258,261,264,266,267,268,271,250,278,280,281,282,283,302,303,304,309,310}	polientilenglicol
<i>EC-Wax</i> ^{297,298}	polietilenglicol
<i>ZB-Wax</i> ^{257,263,285}	polientilenglicol
<i>Carbowax</i> ^{254,311}	polientilenglicol
<i>Supelcowax 10</i> ^{51,297,265,297}	polientilenglicol
<i>HP-Innowax</i> ^{262,267,296}	polientilenglicol
<i>Stabilwax</i> ³⁰⁵	polientilenglicol
<i>HP-1</i> ³⁰¹	polidimetilsiloxano
<i>HP-5ms</i> ^{42,45,291,293,301,324}	5 % fenil / 95 % metilpolisiloxano
<i>HP-20m</i> ²⁵⁵	polientilenglicol
<i>HP PLOT-Q</i> ²⁹⁴	poliestireno-divinilbenceno (polímero poroso)
<i>SPB-5</i> ^{260,292}	5 % fenil / 95 % metilpolisiloxano
<i>BP-10</i> ^{259,260}	14 % cianopropifenil / 86 % metilpolisiloxano
<i>BP-2</i> ³²¹	polientilenglicol
<i>BP-21</i> ^{307,308}	polientilenglicol
<i>DB</i> ^{44,45,276,288}	5 % fenil / 95 % metilpolisiloxano
<i>SE-30</i> ²⁷²	metilpolisiloxano
<i>VF-5ms</i> ²⁸⁹	5 % fenil / 95 % metilpolisiloxano
<i>RTX-5</i> ²⁹⁵	5 % fenil / 95 % metilpolisiloxano
<i>BTR Cw</i> ²⁷³	polientilenglicol
<i>FFAP</i> ^{69,270}	polientilenglicol modificado con ácido nitrotereftálico
<i>SPB1-Sulfur</i> ^{286,287}	Poli(dimetilsiloxano)

Tabla 11: Columnas capilares descritas en la bibliografía.

4.3.4. Sistemas de detección

Existe una gran variedad de detectores que indican los cambios de la composición del eluido de una cromatografía de gases. Los detectores más utilizados en la bibliografía para el análisis de compuestos volátiles en bebidas son el detector de ionización de llama (FID) y el espectrómetro de masas (MS). También se han descrito, en menor medida, el detector de captura electrónica²⁹⁵ (ECD), el detector de nitrógeno-

fósforo²⁶⁹, el espectrómetro de masas de porcentaje de isótopos^{250,294,313} (IRMS: *Isotope Ratio Mass Spectrometry*) y el detector de quimioluminiscencia^{286,287}. El FID y el MS se consideran detectores universales frente al ECD, que es selectivo para compuestos que contienen átomos electronegativos y el detector de nitrógeno-fósforo, específico para compuestos que contenga nitrógeno o fósforo. El MS se utiliza fundamentalmente para la identificación y/o confirmación de analitos. Aylott, R.I. et al.⁶⁷ emplean la espectrometría de masas precedida de una pirólisis a 530 °C, con el objetivo de comparar muestras desconocidas con productos de referencia en pruebas de autenticidad del whisky. El análisis de isótopos estables es una herramienta útil para estudiar la autenticidad y posible adulteración de una bebida, ya que las variaciones en la composición isotópica de la misma revelan cambios en el origen de los compuestos presentes. En la bibliografía^{250,294,313} se ha medido el porcentaje de isótopos mediante combustión hasta CO₂ en un reactor oxidativo (en el caso de la proporción de isótopos ¹³C/¹²C) o mediante pirólisis hasta CO en un reactor (proporción de isótopos ¹⁸O/¹⁶O) o hasta H₂ en un tubo cerámico (proporción de isótopos ²H/¹H).

El detector de quimioluminiscencia, introducido recientemente, posee una elevada sensibilidad y selectividad, ambas necesarias para la determinación de compuestos azufrados en vinos y destilados, que constituye una tarea difícil debido a la volatilidad y bajas concentraciones de estos compuestos. Este detector se basa en la combustión de los compuestos azufrados, que genera monóxido de azufre. Posteriormente, se utiliza una sonda cerámica de alta pureza para recoger los productos de la combustión, que son conducidos bajo vacío al detector de quimioluminiscencia. En la celda de reacción, el monóxido de azufre reacciona con el ozono para generar una molécula de óxido de azufre en estado excitado. La luz emitida por este compuesto al volver al estado fundamental será captada por el detector.

Aparte de los detectores mencionados anteriormente, y como complemento de los mismos, se han descrito en la bibliografía varios métodos olfatométricos^{312,251,259,261,267,311,324} acoplados a la cromatografía de gases (GC-O), que son capaces de proporcionar información sobre la calidad organoléptica de los productos. Estas técnicas se utilizan para la evaluación del perfil aromático, la selección de los compuestos del aroma activos en una mezcla compleja y la identificación de los compuestos clave del aroma (responsables de defectos o bien de características distintivas de las bebidas). Los detectores olfativos y los FID suelen estar configurados en paralelo, de forma que el efluente de la columna se divide entre ambos sistemas de detección (al efluente destinado al detector olfativo se le añade aire o N₂ humedecidos para evitar la sequedad nasal). También se ha empleado el análisis sensorial para la caracterización aromática de bebidas^{247,256,259,311,319,325,326,327}.

La *nariz electrónica* surgió con el propósito de desarrollar un instrumento capaz de imitar la nariz humana y proporcionar información sensorial rápida y objetiva. Esta técnica consiste en la introducción de una fracción del espacio de cabeza de la muestra en un sistema de detección, que genera un conjunto de señales que contienen información sobre la composición volátil de la misma. Este conjunto de señales es como una “huella dactilar” de la muestra analizada en su conjunto (no se realiza separación previa de los analitos). Cuando se analizan varias muestras, se genera una matriz de datos que es posteriormente tratada mediante técnicas quimiométricas con el objetivo de comparar muestras en función de su composición volátil y así poder discriminarlas según su origen, variedad, pureza, maduración y otras propiedades. Aunque la nariz electrónica se utiliza fundamentalmente para obtener información cualitativa, también se puede usar con finalidades cuantitativas mediante técnicas de calibración multivariante. Las narices electrónicas clásicas estaban basadas en sensores de gases³²⁸, mientras que las modernas utilizan espectrómetros de masas^{329,330,331,332}. El uso de espectrómetros de masas presenta ciertas ventajas con respecto a los sensores de gases, ya que muchos componentes presentes en el espacio de cabeza, como el etanol, pueden interferir con los sensores de gases.

4.3.5. Aplicaciones

El aroma y el *flavour* constituyen uno de los criterios de calidad más importantes en los alimentos y bebidas, ya sean frescos o procesados. Por ello, se necesita información cualitativa y cuantitativa para caracterizar los compuestos responsables del aroma. Muchas de las necesidades del análisis del aroma en los alimentos y bebidas surgen por motivos nutricionales y de salud, pero otras razones para el análisis de alimentos incluyen el control de procesos o la garantía de calidad, la aceptación del *flavour* por parte del consumidor, el control de la adulteración, la identificación del origen, o el uso de los alimentos y bebidas para la obtención de productos naturales con gran variedad de aplicaciones. Las necesidades analíticas de la determinación de aromas en alimentos y bebidas se originan para dar respuesta a las preguntas sobre su composición natural, los compuestos químicos que aparecen en ellos como aditivos y contaminantes, así como los cambios que sufren dichos alimentos y bebidas como consecuencia de procesos naturales o inducidos por el hombre.

La industria de los zumos de frutas se ha convertido en uno de los negocios agrícolas más importantes del mundo (en especial el zumo de naranja), siendo el aroma una característica clave de este producto. La comparación del perfil aromático de

zumos de naranja naturales* y zumos procesados (vendidos como zumos concentrados y congelados) reveló importantes diferencias, como unos niveles más bajos de butanoato de etilo (indicador de la calidad de la fracción aromática del zumo) en los zumos procesados, lo que revelaría una disminución en la calidad aromática frente a los zumos naturales²⁸⁹. También Tønder, D. et al.²⁶⁷ encontraron diferencias significativas en el aroma de zumos de naranja naturales y zumos comerciales reconstituidos. El perfil aromático de zumos de piña naturales se ha estudiado en comparación con zumos de piña comerciales elaborados a partir de zumo concentrado o de los restos procedentes de la elaboración de la piña en conserva²⁶⁴. El perfil de los zumos naturales se caracterizó por la presencia de ésteres, mientras que en la mayoría de los zumos comerciales se detectó un número mucho menor de compuestos, que estuvieron presentes a concentraciones más bajas.

El conocimiento de la composición del aroma de la uva destinada a la elaboración del vino puede proporcionar información útil para predecir la calidad del vino. En este sentido, se ha estudiado la evolución de los componentes volátiles de la variedad de uva *Vitis vinifera* durante la maduración³⁰⁷. El método empleado demostró ser útil para determinar la fecha óptima de la vendimia en función de la composición volátil. El moscatel de Bornova (“Muscat de Bornova”, de origen turco) es un vino blanco con un aroma varietal predominante, responsable de los atributos florales y afrutados. Dado que los compuestos responsables del aroma varietal se encuentran fundamentalmente en el hollejo de las uvas, Selli, S. et al.²⁵⁶ han evaluado la influencia del tiempo de maceración en la composición aromática del vino, concluyendo que la maceración de seis horas produjo los vinos con mayor aroma afrutado y que fueron preferidos sensorialmente, frente a los vinos con doce horas de maceración y los que no fueron macerados.

La variedad de uva empleada para elaborar un vino determina, en gran medida, el aroma final de éste. Esto se debe a la permanencia de ciertos compuestos de la uva, muchos de ellos de tipo terpénico, durante todo el proceso de vinificación. Piñeiro, Z. et al.²⁸² han realizado una caracterización de la fracción volátil (compuestos terpénicos y compuestos volátiles fermentativos) de vinos monovarietales, y han estudiado la influencia que tienen las prácticas de vinificación sobre dicha fracción. Los resultados revelaron que los compuestos terpénicos son los más directamente relacionados con el aroma varietal. Los compuestos volátiles generados durante la fermentación alcohólica presentaron una composición relativamente diferente dependiendo del tipo de fermentación realizada y, en particular, si se realizó maceración de las partes sólidas durante el proceso. En el caso de vinificación sin maceración, se observó un aumento

* En este párrafo nos referimos a zumos naturales en el sentido de zumos recién hechos, ya que fueron elaborados por los autores de los artículos mencionados.

relativo de los ácidos grasos y sus ésteres etílicos, mientras que en la vinificación con maceración, los ésteres etílicos de los ácidos láctico, acético y succínico fueron los compuestos relativamente más abundantes. Al igual que ocurre en los vinos, la calidad de la materia prima es uno de los factores con mayor influencia en las características y la composición química de los destilados de orujo, ya que la uva aporta, entre otros compuestos (etanol, alcoholes, ésteres, etc.) una serie de compuestos aromáticos responsables del aroma primario o varietal (terpenos y norisoprenoides C_{13}). La determinación de los compuestos aromáticos varietales de destilados de orujo gallegos mostró diferencias significativas en los destilados obtenidos de diferentes variedades de uva²⁷⁹.

El proceso de envejecimiento en madera del vino es una de las etapas más importantes para obtener un vino de calidad y tiene como objetivo mejorar sus características sensoriales produciendo, entre otras características, un vino con un aroma más complejo. Ortega-Heras, M. et al.²⁵⁴ han estudiado los cambios en la composición volátil de vinos de distintas variedades durante el envejecimiento en barricas nuevas de roble americano. Los resultados obtenidos reflejaron que la capacidad del vino para extraer compuestos volátiles de la madera depende de la variedad de uva utilizada. También se observó que los cambios en la composición volátil de los vinos inducidos por el envejecimiento en madera fueron más importantes durante los primeros cuatro meses. Además, los compuestos volátiles analizados permitieron clasificar correctamente los vinos en función del tiempo que habían estado en contacto con la madera. Pérez-Prieto, L.J. et al.²⁵⁵ han estudiado el efecto del envejecimiento en diferentes condiciones (en barrica y en botella) y durante distintos periodos de tiempo sobre los compuestos del aroma del vino, concluyendo que el envejecimiento en madera produce vinos claramente diferentes, cuyo aroma se caracteriza por la presencia de compuestos extraídos de la madera. El análisis de cluster reveló que los vinos podían agruparse en función del tiempo de envejecimiento y de las condiciones del mismo. Garde et al.²⁵⁸ han estudiado la influencia del tipo de barrica empleada en el envejecimiento sobre la composición volátil del vino. Para ello, se evaluó el comportamiento de barricas nuevas y usadas en función del tiempo de envejecimiento. A partir de los resultados obtenidos se observa que, cuando se envejece el vino durante un periodo corto de tiempo (6-9 meses), existen grandes diferencias en la composición de los compuestos procedentes de la madera entre ambos tipos de barricas. Sin embargo, las concentraciones de estos compuestos fueron similares en ambos vinos para tiempos largos de envejecimiento (12-15 meses). Los compuestos que mostraron mayor agotamiento en las barricas usadas fueron aldehídos furánicos, alcoholes fenólicos, aldehídos fenólicos y lactonas de roble.

En relación a la fermentación, se ha estudiado, con buenos resultados, la distinción entre vinos blancos fermentados en barricas de roble americano y roble europeo (francés) en función de la proporción de *cis* y *trans* β -metil- γ -octalactona* ²⁵³. Este método podría ser adaptado para determinar el tipo de madera de las barricas utilizadas en el envejecimiento de otras bebidas, como los destilados. En relación a las cantidades absolutas de lactona *cis* y *trans* en vinos envejecidos en barricas de roble americano y francés, Garde et al.²⁶⁶ concluyeron que la forma *cis* sólo se encontraba en concentraciones por encima del umbral de percepción en vinos envejecidos en roble americano, mientras que otros compuestos como el lactato de etilo presentaron concentraciones mayores en vinos envejecidos en roble francés. Se ha encontrado una correlación importante entre la forma *cis* de la lactona del roble y el tiempo de envejecimiento de los vinos finos de Jerez (entre otros compuestos)²⁶² y de los vinos de Madeira³⁰¹. La composición volátil también ha permitido la diferenciación entre vinos de Madeira jóvenes secos/semisecos, dulces/semidulces y reservas³⁰¹ y entre vinos dulces elaborados de forma distinta (*vinos naturalmente dulces* y *vinos dulces naturales*)²⁹⁹.

Los fenoles volátiles se consideran componentes habituales del aroma del vino. Sin embargo, algunos de esos compuestos pueden producir olores desagradables que afectan negativamente a la calidad del vino. En concreto, la presencia de etilfenoles (4-etilfenol y 4-etilguayacol) en vinos tintos ha llevado a los catadores a describir en estos vinos olores *fenólicos* y característicos de un establo. Los vinilfenoles (4-vinilfenol y 4-vinylguayacol), en cambio, se encuentran en mayores concentraciones en vinos blancos que en tintos (tan como describen Castro, R. et al.³⁰²) y son responsables de olores *medicinales* y *picantes*. Los vinilfenoles son producidos por bacterias del género *Brettanomyces/Dekkera* a partir de los ácidos *trans* ferúlico y *trans* *p*-cumárico. Posteriormente, los vinilfenoles se transforman en etilfenoles mediante reacciones de reducción. Por este motivo, es importante controlar las concentraciones de estos compuestos durante la elaboración del vino. En este sentido, y con el objetivo de encontrar compuestos indicadores de la contaminación del vino por este microorganismo, Domínguez, C. et al.²⁸¹ han referido un aumento en las concentraciones de 4-etilfenol en vinos finos que sensorialmente presentaban una contaminación importante por *Dekkera*, frente a vinos finos de la misma solera que sólo tenían una contaminación leve.

Las bebidas alcohólicas de color rojo como el vino tinto, el licor de arándanos, de frambuesa, etc. se utilizan frecuentemente en Japón para disolver drogas estimulantes. Por este motivo, la identificación de estas bebidas es importante para probar la

* También llamada *lactona del whisky* o *lactona del roble*, ya que procede de la madera de roble.

implicación de un sospechoso en un crimen y para seguir la ruta de distribución de la droga. Con este objetivo, se ha desarrollado un método para la identificación de bebidas de color rojo (vino tinto, mosto, licor de fresa, de frambuesa, de arándano y mezclas) usando compuestos del aroma como indicadores²⁷⁶. El método fue capaz de clasificar las bebidas en cinco grupos usando cinco compuestos específicos del aroma como indicadores, por lo que podría tener aplicaciones potenciales en investigaciones criminales.

El aroma de las bebidas alcohólicas destiladas está formado por cientos de compuestos volátiles derivados de cada una de las etapas de su elaboración. Algunos de estos compuestos ya están presentes en uvas y vinos, otros vienen de la destilación y otros proceden de la madera (en los destilados que se envejecen en barrica). Caldeira, I. et al.³²⁵ han comparado mediante análisis sensorial el perfil aromático del brandy portugués “Lourinhã” envejecido en siete tipos distintos de madera, cada una de ellas con tres niveles de tostado. Se encontraron diferencias significativas entre los brandies envejecidos en los siete tipos de madera. El nivel de tostado de las barricas también tuvo un efecto significativo en la mayoría de los descriptores del aroma. De acuerdo con resultados previos, se pone de manifiesto las interesantes propiedades sensoriales de los brandies envejecidos en madera de castaño, lo que plantearía la posibilidad de usar esta madera en el envejecimiento del brandy. En el caso del envejecimiento del brandy de sidra, Rodríguez, R. et al.⁶⁹ concluyen que el roble francés facilita el proceso de oxidación, probablemente debido al mayor tamaño de poro de las duelas en comparación con las barricas de roble americano. Según este trabajo, y confirmando las conclusiones de Waterhouse, A.L. et al.²⁵³ para el vino blanco, *cis* y *trans* β -metil- γ -octalactona podrían ser utilizadas para distinguir los brandies de sidra en función del tipo de madera empleada en su envejecimiento, ya que la *trans* β -metil- γ -octalactona se extrae principalmente del roble francés, mientras que la forma *cis* procede en su mayor parte del roble americano.

Después de 15-20 años de envejecimiento, el coñac desarrolla algunos aromas muy apreciados y característicos que se denominan conjuntamente “*rancio charentais*”. Las metilcetonas, derivadas de los ácidos grasos, aumentan significativamente durante el envejecimiento y han sido relacionadas con este aroma característico. Sin embargo, a pesar de que la concentración de las metilcetonas se encuentra correlacionada con las clasificaciones de edad del coñac⁴² se necesitó un total de 33 compuestos volátiles (incluyendo las metilcetonas) para obtener la predicción óptima de la edad del coñac²⁹³.

Park, Y.J. et al.⁴⁵ han establecido una diferenciación entre brandies y whiskeys en base al perfil aromático, lo que sería potencialmente aplicable a la elaboración y control de calidad de ambas bebidas. A su vez, el metanol y los alcoholes superiores

fueron las variables más importantes para la diferenciación entre siete grupos de bebidas destiladas (brandies de tres orígenes diferentes, coñacs, armañacs, calvados y whiskies)³³³. Además, el contenido en compuestos volátiles también es capaz de diferenciar entre categorías de una misma bebida. En este sentido, la caracterización analítica del Brandy de Jerez realizada por Hitos, P. et al.²⁹ ha permitido clasificar los Brandies de Jerez según los tres tipos comerciales: Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva. El 95 % de los brandies Solera, el 80 % de los Solera Reserva y el 91,7 % de los Solera Gran Reserva fueron clasificados correctamente utilizando como variables las cantidades de furfural, acetato de etilo, dietilacetato de acetaldehído (acetal), lactato de etilo y 2-feniletanol junto con otros parámetros como arabinosa y compuesto fenólicos. El contenido en compuestos volátiles también ha permitido distinguir los destilados de sidra envejecidos en barricas de roble americano según el tiempo de envejecimiento y según el material de partida (sidra elaborada según la tecnología tradicional y sidra obtenida a partir de zumo de manzana concentrado)^{314,270}. De esta forma, se puede establecer la influencia de la elaboración en la calidad final del producto.

El destilado griego “Mouro” proviene de la destilación de las frutas fermentadas del árbol de la zarzamora (*Morus nigra* L.). La caracterización de su perfil aromático ha reflejado la necesidad de una mejor estandarización en la producción y calidad de este destilado, sobre todo en lo que respecta a la fermentación, envejecimiento y condiciones de los alambiques utilizados³¹⁷. Resultados similares se han encontrado para el destilado griego “Koumaro” (obtenido a partir del fruto del arbusto *Arbutus unedo* L., conocido como el árbol de la fresa), que precisaría de un mejor control de calidad sobre todo en lo referente a la calidad de la fruta, los procesos de fermentación y almacenamiento, la destilación y las buenas condiciones de la maquinaria³¹⁸. Otro destilado griego, el “Tsipouro”, se elabora a partir de subproductos de la vinificación. La comparación entre el perfil aromático del Tsipouro de elaboración casera y el comercial ha revelado que las muestras comerciales presentaron menores concentraciones de la mayoría de los compuestos estudiados (metanol entre ellos), lo que indica una mejor calidad del Tsipouro comercial³¹⁶. Las concentraciones de los compuestos estudiados en el Tsipouro dependen de la forma de elaboración del vino, de la tecnología de destilación aplicada y del estado higiénico del material de partida, aspectos que podrían mejorar la calidad Tsipouro de elaboración casera. Al igual que el Tsipouro griego, el destilado de Orujo, de origen gallego, también se elabora a partir de subproductos de vinificación. También en este caso se han comparado los perfiles aromáticos de destilados de Orujo de elaboración casera y de fabricación industrial, no encontrándose diferencias significativas en las concentraciones de la mayoría de los compuestos³¹⁵. No obstante, las principales diferencias entre ambos grupos se debieron a los compuestos volátiles que provienen del procesado y almacenamiento de la materia prima y no del sistema de destilación empleado.

Entre los azúcares permitidos por la Unión Europea para endulzar bebidas alcohólicas se encuentran la glucosa, la sacarosa, la fructosa e ingredientes que son fuentes de azúcares como la miel y el mosto concentrado. Por el contrario, no está permitido el uso de edulcorantes bajos en calorías como el sorbitol, isomaltitol, lactitol, manitol, sacarina, aspartamo y acesulfamo K. Da Porto, C. et al.²⁹⁷ han evaluado el efecto de la adición de distintos edulcorantes (carbohidratos y no carbohidratos) en la composición volátil de destilados de naranja con un 40% de etanol. Se observó que la sacarosa, la glucosa y el sirope de arce, entre los edulcorantes permitidos, y el aspartamo entre los no permitidos, aumentaban la solubilidad de determinados compuestos volátiles responsables del deseado aroma de naranja de estos destilados. El aumento de la solubilidad, y su consiguiente disminución en el espacio de cabeza, tienen como consecuencia una menor contribución de estos compuestos al aroma de los destilados de naranja.

Castilla La Mancha es una región con una gran producción de melones, que deben ser comercializados en un periodo de tiempo muy corto. La fermentación de los melones y posterior destilación para producir bebidas alcohólicas podría ser una solución al problema de la saturación del mercado. Con este objetivo, Hernández-Gómez, L.F. et al.³¹⁹ han comparado los perfiles aromáticos de destilados de melón elaborados mediante dos métodos de destilación distintos: una columna de destilación y un alambique de cobre. A partir de los resultados obtenidos, se prefirió el alambique de cobre para la obtención de un destilado de melón con un perfil sensorial apropiado.

La determinación de compuestos volátiles también se ha utilizado para detectar compuestos no deseados en el destilado. Los ácidos orgánicos volátiles de cadena corta (C_2 - C_6) son principalmente los compuestos responsables del olor rancio* de los destilados, producido por unas condiciones deficientes de almacenamiento de la materia prima. Por este motivo, se ha estudiado si sería suficiente un periodo de envejecimiento para mejorar las características organolépticas de los destilados, concluyéndose que, aunque el envejecimiento reduce en cierta medida la cantidad de estos ácidos, no supone una mejora importante, por lo que sería necesaria una redestilación para eliminar este defecto organoléptico²⁷⁵. Tampoco se observaron diferencias en relación a la temperatura de almacenamiento de la materia prima. La presencia de compuestos carbonílicos de cadena corta (C_1 - C_6) en bebidas alcohólicas y destilados se considera indeseable, ya que algunos de ellos son responsables de propiedades organolépticas desagradables, además de tener efectos mutagénicos y carcinogénicos. En este sentido, Wardencki, W. et al.²⁹⁵ han desarrollado un método para el análisis de estos compuestos en bebidas alcohólicas y destilados, que ha sido

* En este contexto, nos referimos al rancio como un aspecto negativo, a diferencia del “*rancio charentais*”, mencionado anteriormente para el coñac.

aplicado a vodkas comerciales. Los resultados obtenidos reflejaron que el acetaldehído era el aldehído más abundante en las muestras de vodka, lo que confirma que la oxidación del etanol es un proceso dominante en la producción de bebidas. El metanol es un alcohol tóxico para los mamíferos. Por tanto es importante, para la protección del consumidor, el desarrollo de métodos rápidos para determinar el contenido en metanol de las bebidas alcohólicas, como el desarrollado por Wang, M.L. et al.³²⁰, que podría ser aplicable al seguimiento del contenido en metanol a escala industrial.

La obtención de medidas sensoriales precisas son tareas clave para la industria de las bebidas alcohólicas. Las medidas sensoriales del *olor* (percepción orthonasal) y el *aroma* (atributo organoléptico perceptible por la vía retronasal cuando se saborea) requieren una gran cantidad de tiempo y recursos, a la vez que resultan agotadores para los jueces (sobre todo en bebidas de elevada graduación alcohólica), ya que se extrae una gran cantidad de notas olfativas de cada producto. En este sentido, Peña y Lillo, M. et al.³²⁷ han introducido como novedad la predicción de perfil *aromático* del destilado chileno “Pisco” a partir del perfil *oloroso* utilizando mínimos cuadrados parciales (PLS). Como consecuencia de ello, los protocolos olfativos se podrían reducir, de forma que la evaluación olfatoria se limitara al *olor*, que resulta menos agotador para los jueces. La aplicabilidad directa de estos resultados a otras bebidas alcohólicas destiladas está limitada por el uso de la terminología específica del Pisco, sin embargo, podría adaptarse el modelo, ya que las bebidas tienen características comunes como la matriz hidroalcohólica y el proceso de maduración.

El principal requisito que debe cumplir cualquier sistema de control de calidad para ser utilizado en una industria alimentaria moderna y competitiva es que sustituya a los tediosos análisis de laboratorio utilizados en el control de calidad y en el control de procesos, de forma que proporcione medidas relativamente rápidas, baratas y adecuadas para el análisis de rutina. Por ello, se ha planteado la aplicabilidad de la nariz electrónica basada en espectrometría de masas al control de calidad en la industria, ya que resulta menos costoso que el análisis sensorial realizado por un panel de expertos, que además puede verse afectado por la subjetividad humana a los olores y la variabilidad entre individuos³³⁴. En relación a la diferenciación entre muestras, la nariz electrónica basada en espectrometría de masas se ha utilizado en la bibliografía para clasificar vinos blancos australianos de dos variedades diferentes³³⁰, así como para diferenciar vinos según su origen, variedad y tiempo de envejecimiento³³¹ y brandies de Jerez comerciales en función de las categorías de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva³³². También se ha empleado para obtener información cuantitativa, como la determinación del tiempo de envejecimiento de destilados de azúcar de caña envejecidos en madera³²⁹.

Las pruebas de autenticidad afectan a gran variedad de productos, incluyendo alimentos y bebidas. En la normativa de muchos países, es un requisito que la composición descrita en la etiqueta del producto coincida la de los productos que salen al mercado. Los principales componentes del whisky escocés son alcoholes superiores (*higher alcohols*). Estos alcoholes están presentes en la mayoría de las bebidas destiladas y sus concentraciones podrían ser utilizadas para diferenciar entre categorías de destilados, como whisky, ron y brandies. En este sentido, Aylott, R.I. et al.⁶⁷ han descrito los rangos de concentración de alcoholes superiores (junto con compuestos extraídos de la madera, compuestos fenólicos, etc.) en marcas específicas de whisky, proporcionando un método para verificar la autenticidad de dichas marcas.

El uso de métodos isotópicos tiene una gran aplicabilidad para verificar la autenticidad y determinar la adulteración de bebidas destiladas. Parker, I.G. et al.³¹³ han medido el porcentaje de isótopos de carbono en los compuestos volátiles de una marca de whisky durante dos años de producción, tiempo durante el cual los valores se mantuvieron relativamente constantes. La comparación posterior con whiskies de otras marcas mostró, en efecto, diferencias con respecto al whisky estudiado. Para estudiar la autenticidad del Tequila, Aguilar-Cisneros, B.O. et al.²⁹⁴ midieron el porcentaje de isótopos de carbono y de oxígeno en el etanol contenido en las muestras de tequila, sin embargo, sólo fue posible la discriminación entre tequilas y otros destilados, debido a que estuvo restringida a determinadas materias primas.

4.4. MEDIDA DEL PODER ANTIOXIDANTE

4.4.1. Introducción

Los principales radicales libres que aparecen en el cuerpo humano son el radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxilo ($\cdot OH$), radical nitroxilo (NO^{\cdot}) y radical peroxilo (ROO^{\cdot}). Los radicales libres se producen continuamente en el organismo, principalmente por medio de reacciones bioquímicas redox con oxígeno, que tienen lugar en el metabolismo celular normal. No todos los radicales libres son perjudiciales para el organismo. Las células del sistema inmune crean radicales para matar bacterias y virus, pero si no se ejerce un control por parte de los antioxidantes, las células sanas pueden ser dañadas.

Los radicales libres dañan la membrana celular, impidiendo así que cumpla sus funciones, como el intercambio de nutrientes y desechos. En el interior de la célula, atacan al ADN impidiendo la reproducción celular. Contribuyen al proceso de envejecimiento, ya que dañan las células de la piel y hacen que ésta pierda su elasticidad. También pueden favorecer el crecimiento anormal de las células, dando lugar a una proliferación sin control que provoca tumores, benignos o malignos. Así pues, los radicales libres se han visto implicados en gran cantidad de enfermedades degenerativas o de tipo cardiovascular.

Numerosas investigaciones en los últimos años han confirmado la importancia de una dieta alimenticia rica en antioxidantes, que pueden proteger frente al daño causado por estos radicales. Algunos antioxidantes son bastante familiares, como las vitaminas o compuestos que las forman: la vitamina E, la vitamina C y los carotenoides, incluyendo el β -caroteno. Estos antioxidantes deben ser constantemente aportados por la dieta. Otros, tales como los ubiquinoles* y los tioles antioxidantes, son fabricados por el organismo, pero los niveles de muchos de estos pueden ser reforzados por los suplementos de la dieta³³⁵. Por esta razón, el interés por caracterizar a los alimentos desde el punto de vista de su potencial antioxidante ha sido creciente y se han desarrollado numerosos métodos de laboratorio (*in vitro*) con este fin, si bien es necesario tener presente que la cuantificación por cualquiera de estos métodos de la actividad antioxidante de un determinado alimento no se correlacionará necesariamente con su efecto biológico una vez el hombre lo haya ingerido, puesto que esto dependerá de la biodisponibilidad de los compuestos con carácter antioxidante.

* Los ubiquinoles son las formas reducidas de las ubiquinonas. Son antioxidantes muy eficientes.

Los antioxidantes naturales más conocidos, que preservan la vida de los alimentos, incluyen la vitamina C, carotenoides, tocoferoles y extractos de hierbas, especias y té. En plantas como el romero, tomillo, clavo y jengibre, se atribuye la actividad antioxidante a la presencia natural de compuestos fenólicos. La mayoría de los antioxidantes naturales provienen de las plantas. A su vez, la mayoría de las plantas contienen compuestos que poseen actividad antioxidante. Estos compuestos son los polifenoles, que se encuentran en todas las partes de la planta (raíces, corteza, tallos, hojas, frutos, flores, etc.). Algunas formas se complejan con metales aunque su principal actividad antioxidante la ejercen como aceptores de radicales libres y rompedores de cadena. Las potentes propiedades antioxidantes de los flavonoides, un tipo muy común de polifenoles, han sido objeto de numerosos estudios³³⁶ y constituyen en la actualidad un campo en creciente desarrollo.

4.4.2. Métodos para medir la actividad antioxidante

Por definición, la actividad antioxidante es la capacidad de un compuesto para inhibir la degradación oxidativa, por ejemplo, la peroxidación de lípidos. Los compuestos fenólicos son los principales componentes antioxidantes de los alimentos. Mientras que en los aceites de plantas y grasas, se trata principalmente de compuestos monofenólicos (sobre todo los tocoferoles o vitamina E), los polifenoles solubles en agua son característicos de los productos solubles en la misma (frutas, verduras, té, café, vino). A pesar de que la actividad antioxidante de los polifenoles está asociada a varios mecanismos, su elevada reactividad frente a radicales libres activos se considera el mecanismo principal.

Sería posible medir todos los componentes antioxidantes de una muestra individualmente, pero esto resultaría lento y costoso. Además, los distintos componentes antioxidantes cooperan entre sí frente a la oxidación, por lo que su examen aislado no reflejaría con exactitud los efectos de su acción combinada. Por lo tanto, el interés se centra en la medida de la actividad antioxidante total. Tales métodos consideran la actividad antioxidante como una característica global del producto, sin fijarse en los componentes individuales que contribuyen a ella. La mayoría de los métodos para la medida de la actividad antioxidante se basan en la medida de la inhibición de ciertas reacciones en presencia de antioxidantes. Los más usados consideran la generación de radicales libres, que desaparecerán por efecto de los antioxidantes.

La peroxidación de lípidos por reacciones radicalarias en cadena es una reacción importante para los procesos fisiológicos y toxicológicos en la salud y enfermedad humanas, así como para la estabilidad de productos alimentarios durante su almacenamiento. En las biomembranas, conduce a alteraciones en la estructura y pérdida de la función protectora. La inhibición *in vitro* de la peroxidación de lípidos en microsomas* ha sido estudiada en vinos sudafricanos³³⁷ (tintos y blancos) y en zumos de manzana³³⁸. La actividad antioxidante se midió, una vez terminada la reacción, mediante la adición de ácido tiobarbitúrico (TBA), lo que se traduce en la medida de la absorbancia a 532 nm, de forma que la actividad antioxidante de los vinos fue calculada como porcentaje de inhibición. González-Paramás, A.M.³³⁶ también utilizaron ácido tiobarbitúrico para medir la actividad antioxidante en subproductos de vinificación, mediante peroxidación de lípidos, usando el complejo ascorbato/ Fe^{3+} como sustancia iniciadora del mecanismo de peroxidación.

Los métodos para medir el poder reductor son de los pocos que utilizan compuestos inorgánicos para la medida de la capacidad reductora de las sustancias en estudio, en concreto de su habilidad para reducir Fe^{3+} a Fe^{2+} . El ensayo de uso más extendido, desarrollado por Oyaizu, M.³³⁹ se basa en la formación de ferrocianuro férrico que absorbe a 700 nm. Cuanto mayor sea la absorbancia en el medio de reacción, mayor será el poder reductor de las sustancias antioxidantes que se evalúan. Este método se ha aplicado a la medida del poder reductor en cerveza, vinos tintos y blancos³⁴⁰. Por su parte, en el ensayo *FRAP*³⁴¹ (*Ferric reducing antioxidant power*), la reducción del metal es monitorizada en presencia de 2,4,6,-tripiridil-s-triazina mediante la medida de absorbancia a 593 nm del complejo azul producto de su reacción con Fe^{2+} . El resultado se expresa en equivalentes de ácido ascórbico. Este método se ha utilizado para evaluar la capacidad reductora de vinos tintos envejecidos³⁴² y zumos de granada³⁴³.

Reconocido el papel catalítico que algunos metales tienen en determinados mecanismos de oxidación, resulta de interés determinar la capacidad de una sustancia para quelar estos metales, impidiendo así que se favorezcan los procesos oxidativos. El ión ferroso Fe^{2+} es el más utilizado, aunque se han descritos modificaciones del método original que utilizan Cu^{2+} . En el ensayo desarrollado por Shimada, K.³⁴⁴ se monitoriza la absorbancia a 485 nm del complejo tetrametilmuróxida/ Fe^{2+} , que es inversamente proporcional al poder quelante de la muestra en estudio. Una modificación de este método se ha utilizado para medir la actividad quelante en cerveza, vinos tintos y blancos³⁴⁰.

* Un microsoma es una fracción obtenida mediante centrifugado de células desmenuzadas; contiene lipoides, ácido ribonucleico y especialmente fracciones desmenuzadas del retículo endoplasmático.

Durante la última década se han puesto a punto un gran número de ensayos que emplean radicales libres para la medida de la actividad antioxidante total. Cada uno se basa en la generación de un radical diferente, actuando a través de distintos mecanismos y midiendo distintos puntos finales, normalmente fluorescentes o quimioluminiscentes.

El método *DPPH* se basa en la capacidad del radical libre estable 1,1-difenil-2-picrilhidrazilo (DPPH) para reaccionar con donadores de H. El radical DPPH tiene un máximo de absorbancia a 517 nm y genera un producto incoloro cuando captura un antioxidante. De esta forma, se mide la disminución de la absorbancia de una disolución estable del radical DPPH en presencia de sustancias antioxidantes con grupos OH activos donadores de H capaces de capturar los radicales libres. Este método se ha aplicado a la determinación de la actividad antiradicalaria de coñacs comerciales³⁴⁵, licores de mirto³⁴⁶ (arbusto aromático), vinos tintos envejecidos³⁴² y zumos de granada³⁴³. Milardovic, S. et al.³⁴⁷ han modificado este método, introduciendo la detección amperométrica de la concentración residual del radical libre. El detector amperométrico presenta algunas ventajas sobre el espectrofotométrico, ya que la respuesta del detector no se ve afectada por la falta de transparencia y turbidez de las muestras. El método modificado fue aplicado con éxito a la determinación de la actividad antioxidante de vinos tintos y zumos de frutas. Partiendo del método DPPH, Ukeda, H. et al.³⁴⁸ han desarrollado un sistema FIA basado en la detección mediante resonancia de spin electrónico (ESR) que emplea el DPPH como radical libre modelo. El método ha sido aplicado a vinos tintos y otros alimentos. El sistema de detección presenta como ventaja sobre la colorimetría que está libre de interferencias por parte de los pigmentos presentes en los alimentos.

Un ensayo ampliamente utilizado es el de la ferrilmioglobina/ABTS (ácido 2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) de Miller, N.J. et al.³⁴⁹. En este método, el producto de oxidación del ABTS, el catión-radical de larga vida $\text{ABTS}^{\cdot+}$, se presenta como una excelente herramienta para determinar la actividad antioxidante de antioxidantes donadores de hidrógeno (capturadores de radicales en fase acuosa) y antioxidantes rompedores de cadena (capturadores de radicales peroxilo lipídicos). El radical $\text{ABTS}^{\cdot+}$ se genera mediante la interacción del ABTS con la especie radicalaria ferrilmioglobina, generada por la activación de la metmioglobina en presencia de peróxido de hidrógeno. En este método, se mide el tiempo que tarda el radical ABTS en ser oxidado hasta el radical libre estable ABTS^{++} en presencia de compuestos antioxidantes como los polifenoles, que retarden dicha oxidación o bien disminuyan la absorbancia de la disolución por captura del radical. La absorbancia se mide a 734 nm, longitud de onda en la que el radical coloreado presenta un máximo. El resultado final se expresa como equivalentes del compuesto de referencia 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox, análogo hidrosoluble de la vitamina E)

que generarían la misma respuesta. Este método ha sido utilizado para medir la actividad antioxidante en subproductos de vinificación³³⁶ vinos (tintos y blancos) y zumos de zanahoria³⁵⁰. Una modificación del método de la ferrimioglobina/ABTS ha sido comercializada como kit por la casa *Randox*® (método TAS, *Total Antioxidant Status*), capaz de medir el estado antioxidante total en bebidas. El uso de este kit ha sido descrito en la bibliografía para determinar el estado antioxidante total de cerveza, vinos tintos y blancos³⁴⁰ y bebidas alcohólicas destiladas³⁵¹ (whiskies, cognacs, armagnacs, brandies y ron).

El método de la ferrimioglobina/ABTS presenta distintas variantes, entre ellas la generación electroquímica del catión radical, que es fácilmente detectable mediante espectrofotometría ultravioleta-visible³⁵². La oxidación electroquímica evita la necesidad de usar reactivos oxidantes que podrían producir interferencias. De esta forma, aumenta la sencillez y rapidez de la metodología, que no se ve afectada por la temperatura y únicamente requiere la medida del tiempo y la absorbancia. Los resultados obtenidos mediante este método han sido comparados con los proporcionados por el kit comercial de la casa *Randox*®, no encontrándose diferencias significativas entre ambos^{352,353}. Así, el método electroquímico ha sido aplicado a la medida de la actividad antioxidante en vinos (tintos y blancos)^{352,353}, vinagres^{352,354} *Brandies de Jerez*^{352,354} y subproductos de vinificación³⁵⁵.

Otra modificación del método original de la ferrimioglobina/ABTS se basa en el uso de sustancias de referencia distintas al Trolox, como la (+) catequina³⁵⁶. El ensayo *DMPD*, aplicado a vinos³⁵⁷ y zumos de granada³⁴³, utiliza como radical alternativo al $ABTS^{+}$ el $DMPD^{+}$, generado por oxidación de 5-N,N-dimetil-*p*-fenilendiamina (*DMPD*) con tricloruro de hierro ($FeCl_3$). La medida de la disminución de la absorbancia se realiza a 505 nm, máximo de absorción del radical púrpura, en presencia de sustancias antioxidantes con capacidad de atrapar radicales. Pellegrini, N. et al.³⁵⁸ han adaptado el ensayo original del ABTS a un sistema de inyección de flujo (FIA). Este sistema incluye una bomba de HPLC que impulsa a la fase móvil a través del sistema hasta el detector de fotodiodos alineados ultravioleta-visible. Los resultados obtenidos para la medida de la actividad antioxidante total de varias bebidas (zumos de frutas, té y cerveza) mediante el método FIA no mostraron diferencias significativas en comparación con los resultados del ensayo original.

Arnao, M.B. et al.³⁵⁹ han desarrollado un método para medir la actividad antioxidante total (TAA) usando un sistema enzimático compuesto por la peroxidasa de rábano, peróxido de hidrógeno como sustrato oxidante y el cromóforo ABTS. La TAA se cuantifica midiendo el retraso en la aparición del $ABTS^{+}$, producto de la oxidación del sistema, causado por la presencia de un antioxidante en el medio. La reacción se sigue registrando la absorbancia a 414 nm. Han comprobado la validez del

método aplicándolo a zumos de frutas³⁶⁰. Posteriormente, el método se ha aplicado a zumos de granada³⁴³.

Uno de los métodos utilizados para medir para medir la capacidad de captura de radicales hidroxilo es el ensayo de quimioluminiscencia del luminol. Este método se basa en la capacidad del luminol y compuestos relacionados para producir luminiscencia bajo un flujo de radicales libres (quimioluminiscencia). La emisión de luz se suprime en presencia de sustancias antioxidantes que actúan como capturadores de radicales, y reaparece cuando los antioxidantes se consumen. El tiempo de supresión de luz es indicativo del contenido de antioxidantes del medio. Este método, que resulta muy atractivo por el reducido tiempo de análisis (varios minutos) y la posibilidad de automatización, presenta diferentes versiones. En una de ellas, sugerida por Parejo, I. et al.³⁶¹, se induce la quimioluminiscencia mediante la reacción del Co^{2+} quelatado con EDTA con peróxido de hidrógeno. Este método ha sido aplicado a la medida de la capacidad de captura de radicales hidroxilo en vinos tintos envejecidos³⁴². Otro método para medir la capacidad de captura de radicales hidroxilo es el ensayo de reducción del radical de *Fremy*, que se basa en la capacidad del radical libre estable de *Fremy* (nitrosodisulfonato de potasio) para reaccionar con sustancias capaces de ceder H. El seguimiento de la reacción se realiza mediante espectroscopia de resonancia de spin electrónico (ESR). Este método ha sido aplicado a vinos tintos³⁶². En otra variante del método, propuesta por Whitehead T.P., et al.³⁶³ para la medida de la capacidad antioxidante en fluidos biológicos, los radicales se generan mediante la interacción entre la peroxidasa del rábano y el peróxido de hidrógeno. Estos radicales oxidan a un sustrato luminiscente, el luminol, cuya quimioluminiscencia es realizada por el para-iodofenol. Este método ha sido aplicado a la determinación de la actividad antioxidante del vino tinto en el suero humano³⁶⁴.

El método *ORAC*³⁶⁵ (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) para la medida de la actividad antioxidante se fundamenta en el retraso en presencia de compuestos antioxidantes de la disminución de la fluorescencia de la fluoresceína debido a la acción de radicales peroxilos. La actividad antioxidante se mide en relación a la sustancia de referencia Trolox. Este método ha sido aplicado a zumos de uva³⁶⁶.

La potenciometría es la técnica instrumental que más recientemente ha comenzado a aplicarse a la medida de la actividad antioxidante. Presenta sobre el resto de métodos la ventaja de basar la medida en el comportamiento electroquímico de las muestras, que dependerá directamente de la estructura química de los compuestos antioxidantes, de forma que aquellos con habilidad para actuar como reductores en solución tienden a ser fácilmente oxidables en electrodos inertes. Kilmartin, P.A.³⁶⁷ han clasificado una serie de polifenoles en vinos (blancos y tintos) en función de su fuerza reductora, utilizando voltametría cíclica con electrodo de carbono. Mannino, S. et al.³⁶⁸

utilizan un sistema FIA acoplado a un detector electroquímico con un electrodo de carbono, que permite la medida de la actividad antioxidante de gran número de muestras y no requiere reactivos. Este método ha sido aplicado a vinos por Brenna, O. et al.³⁶⁹.

4.4.3. Aplicaciones

Existe un creciente conocimiento de que el daño producido por los radicales libres sobre las membranas, otros componentes lipídicos de las estructuras, ADN y proteínas contribuye al envejecimiento y al desarrollo de enfermedades crónicas, como cáncer o enfermedades coronarias. Esto ha provocado un interés general en las sustancias capaces de capturar radicales libres, como los polifenoles. El vino y sus derivados, como fuente de polifenoles, han recibido una gran atención en este sentido debido fundamentalmente al efecto inhibidor *in vitro* sobre la oxidación de las lipoproteínas de baja densidad³⁷⁰.

El colesterol es transportado en el torrente sanguíneo por medio de las lipoproteínas. El 20% del colesterol circulante es transportado por las lipoproteínas de alta densidad (HDL, *High Density Lipoprotein*) y el 70% por las lipoproteínas de baja densidad (LDL, *Low Density Lipoprotein*). Las HDL transportan el colesterol desde las arterias hasta el hígado, previniendo la acumulación y oxidación del mismo en las arterias, y por tanto el posible bloqueo del flujo sanguíneo. Las LDL son modificadas por los monocitos, que oxidan sus componentes lipídicos polinsaturados hasta peróxidos lipídicos. Esto conlleva la oxidación del colesterol asociado y su acumulación en las paredes de las arterias, que se van estrechando poco a poco, bloqueando el flujo sanguíneo. De Beer, D. et al.³³⁷ han estudiado la inhibición *in vitro* de la peroxidación de lípidos en microsomas por parte de vinos tintos y blancos sudafricanos. En cuanto a los vinos tintos, *Merlot* fue el que presentó una inhibición más efectiva, mientras que *Ruby Cabernet* y *Pinotage* presentaron la menor inhibición. Entre los vinos blancos, *Chenin blanc* y *Chardonnay* mostraron la mínima y máxima efectividad en la inhibición, respectivamente.

Un gran número de estudios se ha encaminado a identificar los polifenoles responsables de la actividad antioxidante en vinos, concluyendo que los flavanoles mostraron una elevada correlación con el mismo^{337,342,353,369}. En relación a los compuestos individuales, Alonso, M.A. et al.³⁵³ destacan el resveratrol, Brenna, O.V. et al.³⁶⁹ mencionan el ácido gálico y De Beer, D. et al.³³⁷ se refieren al flavanol y éster de ácido tartárico. No obstante, a pesar de confirmar la relación entre el poder antioxidante y el contenido en compuestos fenólicos, Arnous, A. et al.³⁴² concluyen

que la correlación entre las propiedades antioxidantes y los compuestos polifenólicos mostró que los compuestos individuales están débilmente asociados con los parámetros antioxidantes, lo que sugiere que la actividad antioxidante en vinos tintos es la consecuencia de un efecto sinérgico entre varios compuestos fenólicos, por lo que no puede ser atribuida a compuestos específicos. En este sentido, Kilmartin, P.A. et al.³⁶⁷ utilizan la voltametría cíclica para clasificar los polifenoles en relación a su fuerza reductora. Se ha observado un aumento en el poder antioxidante del vino tinto después del envejecimiento, lo que sugiere que los complejos polifenólicos y productos de condensación que aparecen durante el envejecimiento contribuyen de forma considerable a la actividad antioxidante total de los vinos tintos³⁶².

En relación a los destilados, también existen estudios *in vitro* e *in vivo* que demuestran los efectos beneficiosos para la salud derivados de su consumo moderado^{371,372}. Se ha observado un aumento considerable de la actividad antioxidante de *Brandies de Jerez*³⁵⁴, coñacs³⁴⁵ y otras bebidas destiladas³⁵¹ durante el envejecimiento, lo que se atribuye al contacto con la madera. La mayor correlación entre la actividad antiradicalaria y la composición química del coñac se observó en los elagitaninos, que se extraen de la madera principalmente durante el primer año de envejecimiento³⁴⁵. Según Goldberg, D.M. et al.³⁵¹, la actividad antioxidante de los destilados analizados presentó valores intermedios entre los correspondientes a vinos tintos y blancos. Los valores más elevados de actividad antioxidante total se encontraron en armagnacs, cognacs y whiskeys Bourbon, que a su vez presentaron las mayores concentraciones de compuestos fenólicos. Ron, vodka, ginebra y otros destilados dieron valores negativos de actividad antioxidante total, lo que se encuentra en línea con las bajas concentraciones de compuestos fenólicos en estas bebidas. De esta forma, los autores concluyen que el envejecimiento aumenta el contenido en compuestos fenólicos y, por tanto, el poder antioxidante de los destilados. En el *Brandy de Jerez* también se observa un aumento significativo del contenido polifenólico durante el envejecimiento, con la correspondiente contribución al poder antioxidante³⁵⁴. Vacca, V. et al.³⁴⁶ han estudiado los cambios en la actividad antioxidante de licores de mirto durante el almacenamiento en diferentes condiciones (espacio de cabeza constante o creciente y exposición a la luz). Desde el punto de vista estadístico, se observó una disminución significativa en los botes con espacio de cabeza creciente, mientras que el resto se mantuvieron constantes. La actividad antioxidante de los licores de mirto, que se confirma en este trabajo, era de esperar en función de su elevado contenido en compuestos polifenólicos.

Los compuestos polifenólicos presentes en la uva son cedidos al vino en mayor o menor medida dependiendo de las características del proceso de vinificación. Independientemente de esta transferencia, y teniendo en cuenta que la mayor parte de estos compuestos se encuentran en las partes sólidas de la uva, una elevada proporción

permanece en los residuos de vinificación. Por esta razón, existe un creciente interés en la obtención de compuestos polifenólicos potencialmente bioactivos a partir de subproductos de la uva (pepitas, raspones, etc.). Alonso, A.M. et al.³⁵⁵ describen una correlación elevada entre el contenido en compuestos polifenólicos totales de estos productos y la actividad antioxidante que, sin embargo, no pudo correlacionarse con ningún compuesto polifenólico en particular. En este sentido, González-González-Paramás, A.M. et al.³³⁶ han estudiado la relación entre el contenido en flavanoles y la capacidad antioxidante de subproductos de vinificación. Todos los subproductos estudiados demostraron ser ricos en flavanoles sin importar su grado de explotación, ya que incluso las pepitas de uva seca, que se obtienen como producto final después de la extracción del color y de la destilación alcohólica del residuo de vino, todavía conservan importantes concentraciones en flavanoles y una considerable actividad antioxidante.

El interés creciente en las propiedades antioxidantes de los alimentos y sus beneficios para la salud ha dado lugar a múltiples estudios sobre el poder antioxidante en otras bebidas como zumos de frutas. Los resultados obtenidos por Van Der Sluis, A.A. et al.³³⁸ para los zumos de manzana y Talcott, S.T. et al.³⁶⁶ para los zumos de uva reflejan una disminución en la actividad antioxidante y el contenido en polifenoles debida al procesado, que muestra un considerable impacto en la bioactividad de los productos. En el zumo de manzana³³⁸, la mayor parte de antioxidantes se retienen en el residuo y no pasan al zumo, mientras que en el zumo de uva³⁶⁶, la adición de extractos de romero mejora las propiedades físico-químicas por la formación de complejos de copigmentación con antocianinas, no obstante deberían utilizarse métodos para inactivar las enzimas residuales de forma previa a la copigmentación para evitar la degradación de las antocianinas en presencia de ácido ascórbico. En los zumos de granada³⁴³, sin embargo, la actividad antioxidante de los zumos comerciales, obtenidos a partir de la granada entera, fue superior a la de los zumos obtenidos en el laboratorio partiendo sólo de la pulpa, y superior también a la de vinos tintos. Esto se debe a que los zumos comerciales contienen el tanino punicalagina, mientras que los zumos elaborados en el laboratorio sólo contienen trazas de este compuesto.

5. TRATAMIENTOS ESTADÍSTICOS

En este apartado se describen brevemente las técnicas estadísticas empleadas para el pretratamiento y tratamiento de los datos en el apartado de resultados y discusión, así como los principales parámetros estadísticos utilizados.

5.1. PRETRATAMIENTO DE LOS DATOS

En el pretratamiento de los datos se han incluido tanto las transformaciones de variables como las técnicas de reducción de dimensiones, todas ellas encaminadas a eliminar el ruido y hacer a la matriz de datos más apropiada para los tratamientos estadísticos posteriores.

5.1.1. Suavizado

Esta transformación es importante para variables que son en sí mismas función de otra variable, como ocurre en los espectros de infrarrojos.

Se han empleado dos algoritmos de suavizado:

- Media móvil: es un método clásico de suavizado que sustituye cada observación por una media de las observaciones adyacentes (incluida ella misma).
- Savitzky-Golay: este algoritmo ajusta un polinomio a cada segmento sucesivo de curva, por lo que se reemplazan los valores originales por variaciones más regulares. Un polinomio de primer orden sería equivalente a una media móvil.

5.1.2. Derivada

Al igual que el suavizado, esta transformación es relevante para variables que son función de otra variable (datos espectroscópicos).

Se han utilizado dos algoritmos para calcular la derivada:

- Savitzky-Golay: permite calcular derivadas de primer orden o de órdenes superiores. Se basa en una aproximación polinomial de una porción de la curva. Al medida que aumenta el orden del polinomio, éste será más flexible, lo que permitirá una diferenciación más precisa.
- Norris: es un algoritmo alternativo que sólo permite calcular la primera derivada, con la ventaja de que no genera datos perdidos al final del espectro.

5.1.3. Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales (PCA) es un método estadístico multivariante de simplificación o reducción de la dimensión de una tabla de casos-variables con datos cuantitativos, para obtener otra de menor número de variables, combinación lineal de las primitivas, que se denominan componentes principales (PC) o factores, cuya posterior interpretación permitirá un análisis más simple del problema estudiado. El PCA se considera una técnica exploratoria y de pretratamiento de los datos (reducción de dimensiones), como paso previo a la obtención del modelo de calibración.

El PCA es una familia de técnicas computacionales relacionadas con el aislamiento de las fuentes de variación en un conjunto de datos. Esta *variación* debe interpretarse como *información*, por tanto, esta operación equivaldría a extraer información de ese conjunto de datos, es decir, encontrar qué hace a una muestra diferente de otra. El PCA también cuantifica la cantidad de información útil contenida en los datos, frente al ruido presente en los mismos.

Los datos de partida en un PCA son, en general, los contenidos en la tabla de casos-variables $n \times p$. El proceso aborda seguidamente el cálculo de las componentes principales. Los componentes C serán combinaciones lineales de las p variables x_1, \dots, x_p de la forma:

$$\begin{aligned} C_1 &= a_{11}x_1 + \dots + a_{1p}x_p \\ &\vdots \\ C_p &= a_{p1}x_1 + \dots + a_{pp}x_p \end{aligned}$$

Donde los a representan los pesos de cada variable en cada componente. Existirán tantos componentes $C_1 \dots C_p$ como número de variables. Cada componente explica una parte de la varianza total, considera ésta como una manera de valorar la información total de la tabla de datos. En PCA se suele utilizar el concepto *varianza explicada*, que mide el porcentaje de la varianza total que es explicado hasta la componente principal en cuestión (se trata de una varianza acumulada). Si se consigue encontrar pocos componentes (k) capaces de explicar casi toda la varianza total, podrán sustituir a las variables primitivas. Normalmente, sólo las primeras componentes principales contienen información útil, mientras que las últimas sobre todo describen ruido, por ello es útil estudiar sólo las primeras componentes principales en lugar del conjunto de datos de partida no sólo porque reduce la complejidad de la matriz de datos, sin también porque asegura que el ruido no es confundido con información.

La dificultad en la interpretación de los componentes principales estriba en la necesidad de que tengan sentido y midan algo útil en el contexto del fenómeno estudiado. Por tanto es indispensable considerar el peso que cada variable original tiene dentro del componente elegido, así como las correlaciones existentes entre variables y componentes principales. Un componente es una función lineal de todas las variables, pero puede estar muy bien correlacionado con algunas de ellas, y menos con otras. En este sentido, cada variable puede ser representada como una función lineal de los k componentes retenidos, donde los pesos o cargas de cada factor (cargas factoriales o *factor loadings*) en la variable coinciden con los coeficientes de correlación. El cálculo matricial permite obtener de forma inmediata la tabla de coeficientes de correlación variables-componentes ($p \times k$), que se denomina matriz de cargas factoriales:

$$\begin{aligned} x_1 &= r_{11}C_1 + \dots + r_{1k}C_k \\ &\vdots \\ x_p &= r_{p1}C_1 + \dots + r_{pk}C_k \end{aligned}$$

Estas ecuaciones, contrarias a las inicialmente planteadas, son de mayor utilidad en la interpretación de los componentes.

Aparte de los *loadings*, otro conjunto de atributos que caracteriza a cada componente de un modelo de ACP son los *scores*, que describen las propiedades de las muestras. Los *scores* describen la estructura de datos en términos de patrones de muestra y sobre todo muestran diferencias o parecidos entre muestras. Cada muestra tiene un *score* en cada CP, que refleja la posición de la muestra a lo largo de ese CP.

Datos discrepantes en Análisis de Componentes Principales

Un dato discrepante u *outlier* es una muestra que parece tan diferente de las demás que puede que no sea bien descrita por el modelo o que ejerza demasiada influencia sobre él. Como consecuencia, es posible que uno o más componentes del modelo se dediquen exclusivamente a intentar describir porqué esa muestra es diferente de las demás, incluso aunque esto sea irrelevante para la estructura presente en las otras muestras.

En ACP, los datos discrepantes han sido detectados utilizando, de forma conjunta, las gráficas de *scores*, los residuos y el *leverage*:

- Las gráficas de *scores* muestran el patrón de la muestra de acuerdo con una o dos componentes y permiten detectar muestras que estén muy alejadas del resto y que podrían ser datos discrepantes.
- Residuos: miden en qué medida las muestras o variables se ajustan al modelo determinado por las CPs. Las muestras con elevados residuos están mal descritas por el modelo y no encajan bien con las demás muestras, por lo que serían posibles datos discrepantes.
- *Leverages*: miden la distancia de la muestra proyectada al centro, en el espacio descrito por el modelo, es decir, reflejan lo diferente que es una muestra o variable comparada con la mayoría. Las muestras con elevados *leverages* tienen una gran influencia en el modelo y podrían ser datos discrepantes. El tipo más peligroso de dato discrepante es aquella muestra que tiene elevado residuo y elevado *leverage*.

5.1.4. Transformada de Fourier

En 1822 el matemático francés J. Fourier demostró que cualquier función periódica podía expresarse como una suma infinita de funciones exponenciales complejas y periódicas. Años después, sus ideas fueron generalizadas primero a funciones no periódicas y, posteriormente, a señales temporales discretas, tanto periódicas como no periódicas. Fue después de esta generalización cuando su descubrimiento se convirtió en una herramienta muy útil para el cálculo computacional, culminando en 1965 con el desarrollo de un nuevo algoritmo denominado transformada de Fourier rápida (FFT). A partir de entonces, la FT se hizo cada día más popular.

La *transformada de Fourier* (FT) es una de las herramientas más conocida y utilizada en cualquier disciplina científica. Usando este tipo de transformada, una señal $Y = f(x)$ puede ser representada como una combinación de funciones básicas, normalmente senos y cosenos. Esto significa que la señal original es descompuesta en una suma de señales sinusoidales a diferentes frecuencias. La FT tiene dos ventajas fundamentales: es simple y se puede explicar en términos físicos (naturaleza ondulatoria de muchas señales).

En la presente Tesis Doctoral, se ha hecho uso de la FT como técnica de reducción de dimensiones. La FT consiste en la transformación de una señal del dominio original al dominio de frecuencias, y el posterior filtrado (de paso bajo) de la misma, a partir de un valor de frecuencia determinado, con el fin de eliminar la información redundante y de alta frecuencia (ruido). De este modo, se seleccionan una serie de amplitudes dominantes en el espacio de Fourier, que contienen casi toda la información útil de la señal, que luego serán utilizadas como parámetros de entrada a otros métodos estadísticos (en nuestro caso, las redes neuronales artificiales). Finalmente, se recompone la señal en el dominio original mediante la transformada de Fourier inversa y se calcula el error de recomposición. Este procedimiento permite comprimir la información contenida en los datos de partida, con el fin de simplificar el desarrollo de los posteriores modelos de clasificación y calibración multivariante desarrollados en la presente Tesis Doctoral.

El proceso de filtrado y reducción de dimensiones de los espectros infrarrojos mediante TF fue llevado a cabo por una aplicación programada en entorno MATLAB® y aparece detallado a continuación:

1. Una vez suministrada la información referente a los números de onda de los espectros infrarrojos registrados, se selecciona el número de frecuencias de Fourier del espectro resultante, en el que se van a descomponer cada una de las señales. Los espectros de Fourier fueron de 128 frecuencias (un número múltiplo de 2^N , donde N es un entero positivo).
2. Seguidamente, la aplicación calculó la transformada de Fourier de cada señal presentada, transformándola en un espectro de Fourier de 128 frecuencias.
3. Después se realizó el filtrado, definiendo para ello una frecuencia de corte. De este modo, se eliminan todas aquellas frecuencias que se encuentren por encima de la elegida. Esto equivale a la aplicación de un filtro de paso bajo, que desestima las frecuencias más altas, correspondientes normalmente a ruido, y retiene exclusivamente las frecuencias bajas o de amplitud máxima, que contienen la mayor parte de la información útil. En estos momentos, la matriz de datos inicial

con 497 variables para cada muestra (números de onda de los espectros infrarrojos en el rango 900-1500 cm^{-1} , adquiridos aproximadamente cada 3,86 cm^{-1}) se ha transformado en una matriz con sólo 15 variables por muestra, según la frecuencia de corte definida.

4. Por último, la señal de cada espectro se reconstruyó en el dominio original mediante la transformada de Fourier inversa y se calculó el error de recomposición mediante la expresión:

$$\varepsilon = \sqrt{\sum_{i=1}^N \frac{(e_i - e_i^*)^2}{e_i^2}} \cdot 100$$

Donde e_i y e_i^* son los valores de la señal inicial y de la reconstruida, respectivamente y N el número de muestras de la matriz de datos. Según la frecuencia de corte que se haya elegido, se obtendrán unas dimensiones más o menos pequeñas para cada muestra. No obstante, cuánto más pequeña sea la frecuencia de corte, más se reduce el número de dimensiones, aunque a costa de obtener un error de recomposición más elevado. El objetivo final de esta aplicación consistió en obtener una frecuencia de corte útil que permitiese obtener, de forma simultánea, el menor número posible de coeficientes de Fourier con un error de recomposición mínimo de las señales.

5.2. ANÁLISIS CLASIFICATORIO

En análisis clasificatorio se construyen modelos capaces de pronosticar la pertenencia de un objeto a una categoría sobre la base de las características del objeto. La matriz de datos contiene al menos una variable categórica, que indica la categoría a la que pertenece cada objeto y que constituye la respuesta o variable que se quiere predecir, y una o más variables de escala que describen otras tantas características de los objetos y que se utilizan como variables predictoras.

5.2.1. Análisis Lineal Discriminante

El análisis lineal discriminante (LDA) es una técnica de análisis multivariante que resulta adecuada cuando tenemos una variable dependiente categórica y varias variables independientes continuas o cuantitativas³⁷³. El objetivo del LDA es establecer reglas de clasificación o asignación de unidades a los grupos, basadas en las puntuaciones de las variables independientes. Para ello, el LDA proporciona una o más funciones discriminantes, que son combinaciones lineales de las variables independientes, construidas de tal modo que el conjunto de pesos sea óptimo para una máxima discriminación entre los grupos, por lo que el análisis discriminante es un proceso de maximización matemática. De algún modo, podría interpretarse como maximizar la variación entre grupos, con respecto a la variación intragrupos. El resultado es una o varias combinaciones lineales, o funciones discriminantes, que se expresan por medio de una ecuación como la siguiente:

$$Z = a_1X_1 + a_2X_2 + \dots + a_pX_p$$

Donde:

Z = Puntuación discriminante.

A_j = Peso discriminante para la variable j -ésima ($j = 1, 2, \dots, p$)

X_j = Variable independiente o predictora.

Si existen sólo dos categorías, la clasificación se realiza en función de los valores de la función discriminante. En el caso de que existieran tres categorías, sería necesario construir dos funciones discriminantes Z_1 y Z_2 , de forma que la función Z_1 distinguiría una categoría de las otras dos y la función Z_2 distinguiría las dos categorías restantes entre sí. En general, a partir de q categorías se obtienen $q-1$ funciones discriminantes.

El procedimiento preferido por la mayor parte de los investigadores para la validación de un modelo de clasificación se basa en las matrices de clasificación, que representan el grado de seguridad predictiva del modelo.

Datos discrepantes en Análisis Lineal Discriminante

La detección de datos discrepantes se llevó a cabo mediante una estandarización de los datos previa al análisis lineal discriminante. En la estandarización, los valores de las variables son reemplazados por valores estandarizados que se calculan de la siguiente forma:

$$z_i = \frac{(x_i - \bar{x}_i)}{SD}$$

Donde z_i son los valores estandarizados, x_i los valores originales y SD la desviación estándar. Los valores estandarizados cuyo valor absoluto fuese mayor que 2 fueron considerados datos discrepantes.

5.2.2. Validación de un modelo de clasificación

La validación de un modelo de clasificación consiste en establecer sus capacidades de reconocimiento y de predicción. La capacidad de reconocimiento se evalúa, directamente, como el porcentaje de objetos del conjunto de entrenamiento que son clasificados correctamente. Por ejemplo, 48 objetos clasificados correctamente de un total de 50 indican una capacidad de reconocimiento del 96 %.

En cambio, para establecer la capacidad de predicción del modelo, es necesario definir previamente un conjunto de prueba o evaluación, que debe estar formado obligatoriamente por objetos de los que se conoce su pertenencia a las categorías, pero que no se incluyeron en el conjunto de entrenamiento con el que se desarrolló el modelo (deben ser objetos similares a los del conjunto de entrenamiento). La capacidad de predicción es el porcentaje de objetos del conjunto de evaluación que son clasificados correctamente por el modelo. Por ejemplo, si se tienen 25 objetos nuevos (no utilizados para desarrollar el modelo), y de ellos 23 son clasificados correctamente, entonces la capacidad predictiva del modelo es del 92 %.

5.3. REGRESIÓN

La regresión es un término genérico para todos los métodos que intentan ajustar un modelo a los datos observados con el objetivo de cuantificar la relación entre dos grupos de variables. El modelo obtenido puede ser usado bien para describir la relación entre los dos grupos de variables o bien para predecir nuevos valores. En la regresión lineal simple se obtienen modelos capaces de predecir una variable respuesta conociendo los valores de otra variable correlacionada con ella y que se utiliza como variable predictora. En este capítulo se amplían los métodos de predicción cuantitativos, considerando los casos en los que es necesario tener en cuenta varias variables predictoras para predecir una única respuesta (regresión múltiple), o también para predecir varias respuestas interdependientes (regresión multivariante).

5.3.1. Regresión Lineal Multivariante

La regresión lineal múltiple (MLR), basada en la regresión de mínimos cuadrados, permite analizar la relación entre una única variable dependiente cuantitativa (criterio) y varias variables independientes cuantitativas (variables predictoras)³⁷³. El objetivo es utilizar las variables independientes, cuyos valores son conocidos, para predecir los valores de una única variable dependiente, seleccionada por el investigador. De este modo, se pretende explicar el comportamiento de una variable, a la que denominaremos dependiente. Para ello no será suficiente una única variable, como ocurría en la regresión lineal univariante (por ejemplo, en la calibración) sino que se necesita ampliar el número de variables para explicar los cambios que se producen en la variable dependiente³⁷⁴.

El supuesto básico de la regresión múltiple es la existencia de una relación entre las variables independientes, a las que denominaremos X_1, X_2, \dots, X_k , y la variable dependiente Y . Esto es, podremos escribir la siguiente ecuación:

$$Y_i = f(X_{1i}, X_{2i}, \dots, X_{ki}) + \varepsilon_i$$

Donde ε_i representa el error que cometemos al intentar aproximarnos al valor Y_i mediante la función f . Al igual que en la regresión simple, como punto de partida supondremos que la relación entre las variables es lineal y aditiva, por lo que la ecuación anterior se podrá escribir de la forma:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \dots + \beta_k X_k + \varepsilon$$

Donde ε representa el término de error.

El resumen del proceso general es el siguiente: se pretende calcular la ecuación de regresión “verdadera”, esto es, la ecuación del plano que mejor se ajusta a la nube de puntos de la población bajo estudio. Para ello, se dispone de los datos obtenidos en una muestra representativa de la población. A partir de estos datos, se obtienen unos estimadores de los coeficientes β_0, \dots, β_k de la ecuación de regresión, a los que denominaremos b_0, \dots, b_k . En la muestra, se ajustará a la nube de puntos un plano de ecuación:

$$Y = b_0 + b_1X_1 + b_2X_2 + \dots + b_kX_k + e$$

El plano que mejor se ajuste a nuestra nube de puntos será denominado plano de regresión.

5.3.2. Regresión de Componentes Principales

En la regresión lineal múltiple, el modelo se obtiene utilizando directamente las variables manifiestas como predictoras. En cambio, en el método de regresión de componentes principales (PCR), se realiza primero un análisis de componentes principales y luego se establece el modelo de MLR utilizando una selección de los componentes principales como variables predictoras. La PCR es, por tanto, una combinación entre PCA y MLR, que se lleva a cabo en dos etapas:

- Análisis de componentes principales: se aplica sobre la matriz de datos inicial X (variables independientes o predictoras), reduciendo las dimensiones de los datos de partida.
- Proceso de regresión: de las variables Y (variables dependientes o respuesta) sobre una selección de las componentes principales obtenidas a partir de X .

La primera etapa convierte la PCR en una herramienta estadística de grandes posibilidades como método de calibración multivariante. El proceso de reducción sólo se aplica a los datos de X , mientras que Y permanece invariante. Hay que tener en cuenta que los datos de Y no influyen en absoluto en la obtención de las componentes principales de X . El paso clave para llevar a cabo una regresión útil, usando los componentes principales como el conjunto de variables independientes, implica la eliminación de los *scores* y *loadings* no significativos de los datos.

El método PCR presenta las siguientes ventajas:

- Reducción de dimensiones del conjunto de datos X : mediante el uso de la PCA, se conserva la máxima cantidad de información posible. Se supone que los componentes minoritarios eliminados contienen ruido o información no relevante relacionada con la matriz Y .
- Relación con las variables originales: puesto que los componentes principales son combinaciones lineales de todas las variables manifiestas, este procedimiento las incluye en el modelo en su totalidad.
- Varianza muy elevada de las componentes principales mayoritarias: esto conduce a una regresión estable, puesto que la varianza de un coeficiente de regresión estimado es inversamente proporcional a la varianza del regresor.
- Fuentes de varianza desconocidas: la PCR permite tener en cuenta en el modelo fuentes de varianza no conocidas por el experimentador y que por ello no se han tenido en, al menos de un modo consciente, en el diseño del bloque Y . Un ejemplo de estas fuentes de varianza desconocidas podría ser una interferencia, una interacción entre el analito y otro componente, etc.

Por su capacidad de adaptación a los factores desconocidos, se dice que la PCR es un método “flexible”, mientras que la MLR, que carece de esa capacidad, es un método “rígido”. Es interesante observar que la capacidad de adaptación es una consecuencia de la reducción de dimensiones, esto es, de la renuncia a intentar explicar toda la varianza contenida en los datos. En efecto, si se toman todos los componentes principales en lugar de unos pocos, el modelo es rígido y coincide con el que se obtiene mediante una MLR en la que se incluyan todas las variables manifiestas.

5.3.3. Regresión por Mínimos Cuadrados Parciales

En PCR se utilizan los componentes principales del bloque X como variables predictoras. Sin embargo, los componentes principales interpretan y modelan la varianza contenida únicamente en el bloque X , y por tanto no tienen por qué estar correlacionados con las respuestas. De hecho, ciertas respuestas pueden estar correlacionadas con componentes que expliquen muy poca varianza. En estos casos, la PCR suele dar modelos de regresión con más vectores de los necesarios, y al contrario, algunos vectores importantes pueden quedar excluidos. En la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLS) se utilizan como variables predictoras vectores que explican

menos varianza que los componentes principales, pero a cambio están más correlacionados con las respuestas. Dichos vectores se suelen denominar “variables latentes”. La expresión “variable latente” significa que el vector en cuestión ha sido optimizado desde el punto de vista de su utilización como variable predictora para predecir una respuesta dada o un pequeño grupo de respuestas.

La PLS presenta las siguientes ventajas en comparación con el método de PCR:

- Se reduce el impacto sobre el modelo de las variaciones del bloque X que no tienen correlación con la respuesta.
- Puesto que se evitan las direcciones del espacio poco correlacionadas con las respuestas, el número óptimo de vectores a incluir en el modelo de regresión suele ser menor que el PCR, con lo que se gana en sencillez, sin perder exactitud en las predicciones.

Según algunos autores, la regresión por mínimos cuadrados parciales es un método mucho más robusto que la PCR y la MLR, ya que los parámetros del modelo no varían mucho cuando se toman nuevas muestras de calibración del total de la población.

Como sucede en PCR, el máximo número de variables latentes que se pueden extraer es igual al número de variables manifiestas. Sin embargo, en la construcción del modelo de regresión se utilizarán sólo las k primeras variables latentes, siendo k igual al número de fuentes de varianza significativas presentes en el bloque X , que además estén correlacionadas con la respuesta. En PLS, y debido a la participación de la respuesta en la construcción de las variables latentes, éstas son distintas para cada respuesta. Por esta razón, si se quiere predecir otra respuesta, se debe repetir todo el procedimiento. En este sentido, la PLS es distinta de la PCR, en la cual, las variables predictoras (los componentes principales del bloque X) son siempre las mismas, independientemente de cuál sea la respuesta que se quiera predecir.

Básicamente, los *scores* o *factores* de PLS se interpretan de la misma forma que los *scores* de PCA: son las coordenadas de las muestras a lo largo de los componentes del modelo. La única diferencia en PLS es que se pueden considerar dos conjuntos diferentes de componentes, según si se quiere observar la variación en el espacio X o Y .

5.3.4. Detección de datos discrepantes en regresión

Los datos discrepantes de las regresiones han sido detectados según se muestra a continuación. En regresión (al igual que en PCA), los datos discrepantes y *outliers* pueden ser detectados utilizando las gráficas de *scores*, los residuos y los *leverages*, aunque algunos de ellos pueden ser identificados de forma diferente:

- En regresión, hay muchas formas de que una muestra se clasifique como dato discrepante. Puede que sea discrepante sólo en relación al bloque X , sólo en relación al Y o a ambos. También es posible que no sea un dato discrepante para cada uno de los grupos de variables por separado, pero que se convierta en *outlier* cuando se considera la relación (X,Y) . Para detectar este último tipo de datos discrepantes, se utiliza la *gráfica de relación de outliers X-Y*. Esta gráfica muestra la relación entre la proyección de las muestras en el espacio X y la proyección en el espacio Y . En general, permite evaluar cómo se ajustan las muestras a la relación (X,Y) .
- La *gráfica de los leverages de cada muestra* revela aquellas muestras con *leverages* más altos que el resto, que pueden tener una gran influencia en el modelo y deberían ser evitadas.
- Para las muestras de calibración, se suele utilizar también un *gráfico de influencia*. Se trata de la representación gráfica de los residuos cuadráticos (de X o Y) frente al *leverage*. Las muestras con elevada varianza residual son posibles datos discrepantes, mientras que las muestras con *leverage* alto son muestras influyentes, es decir, distorsionan el modelo con el objeto de que esas muestras sean mejor descritas. Las muestras que ejercen una mayor influencia en el modelo y pueden ser peligrosas son aquellas que tienen valores altos de residuos y de *leverage*.

5.3.5. Validación de un modelo de regresión

Normalmente, un modelo de calibración se construye a partir de un conjunto de datos de entrenamiento, de forma que el mejor modelo será aquel que ofrezca las mejores predicciones para los datos del conjunto de validación. El criterio de validación se basa en el cálculo del error de predicción, expresado como una suma de cuadrados, *PRESS*, cuya ecuación es la siguiente:

$$PRESS = \sum_{i=1}^m (c_i - \hat{c}_i)^2$$

Donde m es el número total de muestras, c es el valor medido de la propiedad y \hat{c} el valor estimado por el modelo. También se puede utilizar la raíz cuadrada del error de predicción (error cuadrático medio de predicción: *RMSEP*), que se expresa en las mismas unidades que la variable respuesta original:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{PRESS}{m}}$$

La ecuación completa del RMSEP sería:

$$RMSEP = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^m (c_i - \hat{c}_i)^2}{m}}$$

En general, la mayoría de los métodos de calibración suelen elegir el valor de PRESS mínimo como criterio para seleccionar el modelo final, mientras que el RMSEP se utiliza como estimación de los errores de predicción en futuras aplicaciones del modelo seleccionado. Es bastante común utilizar el método de validación cruzada (*cross-validation*). En la validación cruzada, las muestras se dividen en subgrupos o segmentos. Cada vez, se construye un modelo utilizando todos los datos excepto uno de los segmentos, que se utiliza posteriormente para calcular el PRESS. Al final se elige el modelo que posea el mínimo valor de PRESS global. La aproximación más común consiste en desarrollar m procesos de calibración omitiendo una observación cada vez. Este procedimiento, utilizado en la presente Tesis Doctoral, se conoce como *leave-one-out* o *full cross-validation*.

Otros parámetros estadísticos que se suelen proporcionar en la regresión son el error cuadrático medio de calibración (*RMSEC*) y el coeficiente de correlación. El RMSEC es una medida de la diferencia media entre los valores predichos y medidos en la etapa de calibración. La ecuación del RMSEC es similar a la del RMSEP pero

referida a los datos de calibración, y se puede interpretar como el error promedio de modelado, expresado en las mismas unidades que la variable respuesta original.

Para establecer la bondad del ajuste, es decir, la cantidad de la variable respuesta explicada por las predictoras, se utiliza el *coeficiente de correlación múltiple* r (utilizado en el tratamiento de datos en “Resultados y Discusión”). Los valores del coeficiente de correlación múltiple oscilan entre -1 (correlación negativa perfecta) y 1 (correlación positiva perfecta), mientras que un valor de $r = 0$ indica que no existe correlación. El cuadrado de este coeficiente nos proporciona el *coeficiente de determinación*, que cuantifica los cambios de la variable dependiente que han sido explicados por la ecuación de regresión. Dado que explicamos la variable dependiente mediante varias variables, estaremos hablando del *coeficiente de determinación múltiple*, que viene definido de la siguiente forma:

$$R^2 = \frac{\text{Suma de cuadrados explicada}}{\text{Suma de cuadrados total}}$$

Este coeficiente representa el porcentaje de cambios de la variable dependiente que es explicado, de manera conjunta, por las variables incluidas en la ecuación de regresión. Los valores del coeficiente de determinación múltiple oscilan entre 0 (no existe correlación) y 1 (correlación perfecta). A partir de esto y según la definición, se deduce que uno de los objetivos de la regresión es incrementar el valor de ambos coeficientes.

5.4. REDES NEURONALES ARTIFICIALES

Una red neuronal artificial (ANN) es un sistema de procesamiento de datos, basado en la imitación del funcionamiento de los sistemas nerviosos biológicos, y que es capaz de predecir con precisión variables categóricas (clasificación) y de escala (regresión)*. Una no se basa en un modelo algebraico explícito, sino en un conjunto de “unidades de activación”, denominadas también “nodos” o “neuronas artificiales”, que están conectadas entre sí en forma de red.

* Las redes neuronales no se han incluido en los apartados de “análisis clasificatorio” y “regresión” con el objetivo de realizar una descripción conjunta y más extensa del fundamento en este apartado, ya que se considera una técnica más novedosa que las descritas anteriormente.

Como se esquematiza en la *figura 12*, las neuronas biológicas tienen cuatro componentes básicos: dendritas, soma, axón y sinapsis. A través de las dendritas (canales de entrada de la neurona) entran en la neurona las señales procedentes de otras neuronas. Si la suma de las señales recibidas en un momento dado excede un cierto valor umbral, el cuerpo de la célula genera una señal de salida, que viaja a lo largo del axón (el canal de salida) y es transportada a otras neuronas vecinas mediante la sinapsis.

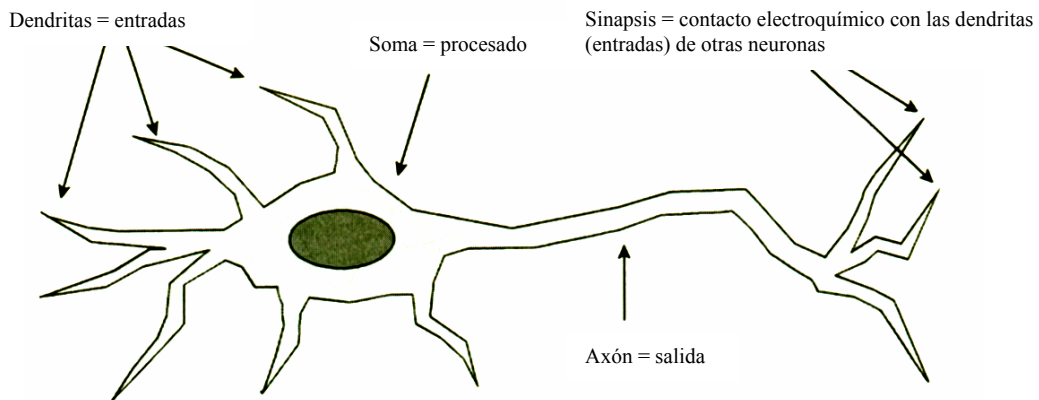


Figura 12: Esquema de una neurona biológica mostrando sus cuatro componentes básicos.

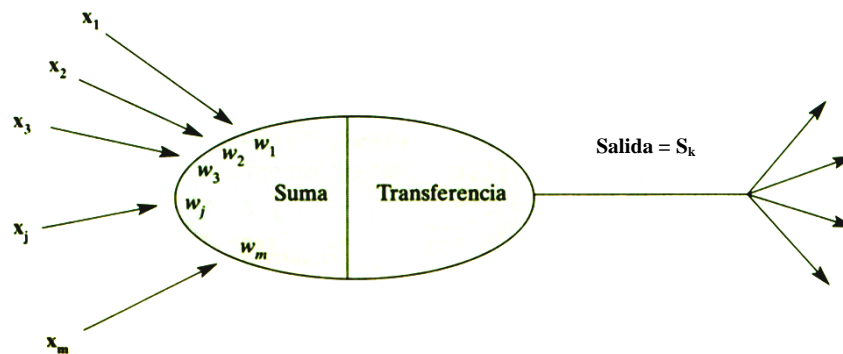


Figura 13: Esquema de una neurona artificial mostrando sus cuatro funciones básicas: ponderar las entradas, sumarlas, calcular la salida y comunicarla a otras neuronas.

Tal como se indica en la *figura 13*, una neurona artificial simula las funciones básicas de la neurona natural. La entrada a esta nueva neurona es la señal que llega a ella procedente de una o más neuronas y la salida significa la señal emitida por ella a la próxima neurona corriente abajo. La neurona artificial contiene dos algoritmos, uno de los cuales calcula la suma ponderada de los valores que le llegan por las conexiones de entrada, y el otro, denominado “función de transferencia” o “función de activación”, genera una respuesta o salida que se comunica a otras neuronas. La red de neuronas es capaz de “aprender”, lo que se realiza principalmente mediante el ajuste de los “pesos” de las conexiones entre neuronas, hasta que la red en su conjunto proporcione predicciones con la suficiente precisión. Este proceso se denomina “entrenamiento de la red neuronal”. Un peso consiste simplemente en un número real. Si el peso es positivo, tiende a estimular a la neurona siguiente para que transmita su propia señal corriente abajo; si el peso es negativo, no provoca esa estimulación. El conjunto de los valores de los pesos asociados con las neuronas en una red determina las propiedades computacionales de la misma. Al inicio del entrenamiento, estos pesos suelen ser elegidos de manera aleatoria.

En la *figura 14* se muestra el esquema de una red neuronal sencilla, con neuronas dispuestas en tres filas o “capas” denominadas capa de entrada, capa oculta y capa de salida. La capa de entrada tiene tantas neuronas como variables manifiestas, y genera a su vez el mismo número de salidas, cada una de las cuales se comunica a todas las

neuronas de la capa oculta. La capa oculta suele tener una o dos neuronas más que la capa de entrada. Finalmente, la capa de salida tiene tantas neuronas como categorías reconocidas existan en los datos (análisis clasificatorio), o como variables de escala se quieran predecir (predicción multicomponente).

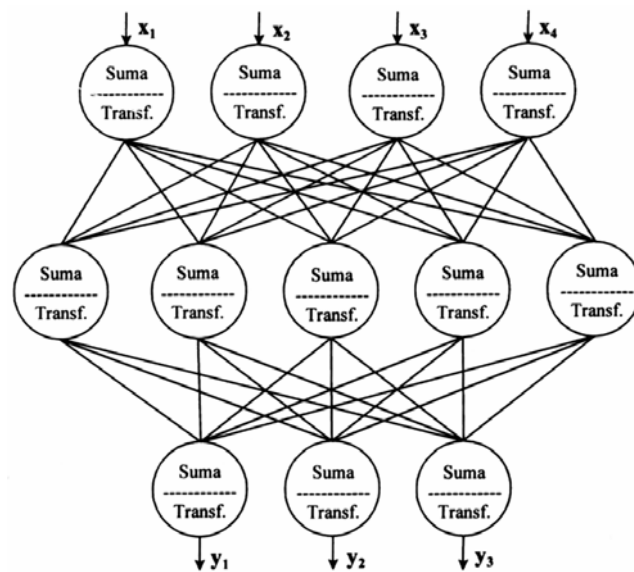


Figura 14: Esquema de una red neuronal diseñada para predecir tres respuestas a partir de cuatro variables predictoras.

Para que la red funcione correctamente es necesario someterla a una etapa de aprendizaje o entrenamiento. Cuando la red está entrenada, las neuronas de la capa de entrada se alimentan con los valores de las variables manifiestas para el nuevo objeto. Los resultados de la capa de entrada se procesan en la capa escondida, y los resultados generados por ésta se procesan de nuevo en la capa de salida. En análisis clasificatorio, los resultados de la capa de salida o “respuestas” son las probabilidades de que el nuevo objeto pertenezca a cada una de las categorías, mientras que en regresión

múltiple, las “respuestas” son los valores predichos para cada una de las variables dependientes.

En una neurona k cualquiera, la suma ponderada de las entradas se calcula del siguiente modo:

$$x_k^* = \sum_{j=1}^m w_{jk} (x_j + \theta_{jk})$$

Donde w_{jk} es el peso aplicado a la entrada x_j , y θ_{jk} es un coeficiente denominado “sesgo”. Cada neurona necesita del sesgo para ajustar todas sus entradas de forma que caigan dentro de la región donde pueden ser utilizadas por la función de transferencia para obtener el mayor beneficio posible del desarrollo completo de la red.

La suma ponderada de las entradas a cada neurona se utiliza para calcular la salida mediante la función de transferencia o función de activación. La más utilizada es la función de transferencia sigmoideal, cuya forma es bastante arbitraria y se encuentra limitada únicamente por dos condiciones: sus valores deben pertenecer al intervalo $[0,1]$ y debe ascender de forma monotonía. La función sigmoideal viene expresada por la siguiente ecuación:

$$s_k = \frac{1}{1 + \exp\left(\frac{1 - x_k^*}{\gamma_k}\right)}$$

Donde γ_k es otro coeficiente denominado “ganancia”. El valor de s_k es la salida de la neurona k , que se alimenta a las entradas de la capa siguiente, salvo si se trata de la capa de salida, en cuyo caso, s_k es una de las respuestas buscadas.

Todas las neuronas de una capa poseen el mismo número de entradas, es decir, el mismo número de pesos w_{jk} , que serán modificados durante el proceso de entrenamiento. Esas entradas proceden de otras tantas neuronas situadas en la capa

inmediatamente anterior (capa de entrada o capa oculta). Sin embargo, cada neurona origina una única salida, obtenida por aplicación de la función de transferencia. La salida final de la red completa está formada simplemente por las salidas colectivas de la capa final de neuronas.

Para cada problema concreto se suele diseñar una red neuronal distinta. El diseño de una red es un proceso iterativo complejo en el cual, mediante el procedimiento de ensayo y error, se establecen, entre otros, los siguientes parámetros: el número de capas ocultas, el número de nodos de la capa oculta, etc. En general, las redes suelen tener tan sólo una o dos capas ocultas, puesto que si se aumenta excesivamente el número de neuronas ocultas se llega pronto a una situación de “sobreajuste”. Una red neuronal está sobreajustada cuando ha “memorizado” todos o casi todos los datos del conjunto de entrenamiento, de modo que es capaz de predecirlos con gran precisión. Sin embargo, la red se vuelve incapaz de “generalizar”, esto es, de realizar predicciones acertadas sobre objetos nuevos*.

Para obtener resultados, la red neuronal artificial debe ser previamente entrenada. Las redes neuronales biológicas aprenden a partir de la experiencia. Las redes neuronales artificiales “aprenden” la solución de un problema ajustando los pesos, sesgos y ganancias durante su etapa de entrenamiento. La capacidad de aprendizaje de una red depende del modo en que está construida, lo que se llama su “arquitectura” o “topología”**, y del método elegido para su entrenamiento. El método de entrenamiento más eficaz es la regla de aprendizaje de *Windrow-Hoff* o método de *retropropagación (backpropagation)*. En el método de retropropagación, se permite que los coeficientes adquieran inicialmente valores al azar, si bien, dentro de ciertos límites. A continuación, se calculan las respuestas, que se comparan con las esperadas para todos los objetos del conjunto de entrenamiento. Se calcula la suma de cuadrados de las diferencias entre los valores esperados y los obtenidos, SC. Con el fin de reducir el valor de SC, se modifican los coeficientes de la capa de salida (γ_k y θ_{jk}) y los pesos de sus conexiones con la capa anterior (w_{jk}), y se vuelven a calcular las respuestas. El proceso se repite sistemáticamente hasta que SC alcanza un valor mínimo, lo que indica que no es posible mejorar más los coeficientes de la capa de salida. Entonces se procede a ajustar los coeficientes de la capa anterior. Cuando se alcanza de nuevo un valor mínimo de SC, se ajustan los coeficientes de la capa inmediatamente anterior, y

* Por este motivo, las redes neuronales utilizadas en esta Tesis Doctoral tendrán una única capa oculta.

** En el capítulo de discusión y resultados definiremos la topología de la red según la nomenclatura X - Y - Z , siendo X el número de neuronas de la capa de entrada, Y el de la capa oculta y Z el de la capa de salida.

así sucesivamente, hasta llegar a la capa de entrada. El proceso de optimización completo se repite cuantas veces sea necesario, hasta que se obtienen respuestas suficientemente precisas. La red queda entonces operativa, preparada para realizar predicciones sobre objetos nuevos.

6. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Fernández de Bobadilla, V. (1990) “El Brandy de Jerez” *Creaciones y Servicios Editoriales S.A.*, Madrid.
- ² Rankine, B. (1999) “Manual Práctico de Enología” *Ed. Acribia S.A.*, Zaragoza.
- ³ Flanzy, C. “Enología: Fundamentos científicos y Tecnológicos” *A. Madrid Vicente Ediciones, Ediciones Mundi-Prensa*, Madrid.
- ⁴ Gómez, J. (1991) La elaboración del Brandy de Jerez. *Vitivinicultura* **11-12**, 37-42.
- ⁵ Orden de 29 de julio de 1985 (Consejería de Agricultura y Pesca) por la que se reconoce la Denominación Específica Brandy de Jerez. BOJA núm. 94, 4-10-95, p.2774.
- ⁶ Decreto 2484/1974 de 9-8-1974. Reglamentación especial para la elaboración, circulación y comercio del Brandy. BOE núm. 218, 11-9-1974.
- ⁷ Resolución de la Dirección General de Industrias Alimentarias y Diversas, por la que se autoriza el empleo de infusiones o extractos hidroalcohólicos de materias naturales en la elaboración de brandy. BOE núm. 60, 11-3-1977.
- ⁸ Real Decreto 1908/1984 de 26-9-1984 por el que se modifica la Reglamentación para la elaboración, circulación y comercio de brandy (Decreto 2484/1974). BOE núm. 256, 29-10-1984.
- ⁹ Orden de 26 de abril de 1989 (Consejería de Agricultura y Pesca), por la que se aprueba el Reglamento de la denominación específica Brandy de Jerez. BOJA núm. 35, 5-5-1989, p.1725-33.
- ¹⁰ Orden de 31 de mayo de 1989 por la que se ratifica el Reglamento de la Denominación Específica “Brandy de Jerez” de su Consejo Regulador. BOE núm. 142, 15-6-1989, p. 18391-6.
- ¹¹ Orden de 23 de junio de 1993 (Consejería de Agricultura y pesca) por la que se modifican algunos artículos del reglamento de la denominación específica Brandy de Jerez, aprobado por la de 26 de abril de 1989. BOJA núm. 114, 21-10-1993, p. 9303-4.
- ¹² Orden de 11 de marzo de 1994 (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación) por la que se ratifica la modificación del reglamento de la Denominación Específica “Brandy de Jerez” y de su Consejo Regulador, aprobada por orden de 23 de junio de 1993 (LAN 1993\322), de la Consejería de Agricultura y Pesca de la Junta de Andalucía, que figura como anexo de la presente disposición, a los efectos de su promoción y defensa por la Administración General del Estado en los ámbitos nacional e internacional.
- ¹³ Directiva del Consejo (88/388/CEE) de 22 de junio de 1988 relativa a la aproximación de las legislaciones de los estados miembros en el ámbito de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales base para su producción. DOCE L N° 184 de 15-7-1988. 61-67.
- ¹⁴ Real Decreto 1477/1990, de 2 de noviembre por el que se aprueba la Reglamentación Técnico-Sanitaria de los aromas que se utilizan en los productos alimenticios y de los materiales base para su producción. BOE n° 280, 22/11/1990. 34604-34611.
- ¹⁵ Myers, D.V. & Howell, J.C. (1992) Characterization and specifications of caramel colours: an overview. *Food Chem. Toxic.* **30**, 359-363.
- ¹⁶ Licht, B.H., Orr, J., & Myers, D.V. (1992) Characterization of caramel colour IV. *Food Chem. Toxic.* **30**, 365-373.

- ¹⁷ Benhura, M.A.N, Mbuya, N. & Machirori, E. (1999) Facile formation of caramel colours using the polysaccharide material that is extracted from the fruit of *Azanza garckeana*. *Food chem.* **65**, 303-307.
- ¹⁸ Ratsimba, V., García Fernández, J.M., Defaye, J., Nigay, H. & Voilley, A. (1999) Qualitative and quantitative evaluation of mono- and disaccharides in D-fructose, D-glucose and sucrose caramels by gas-liquid chromatography-mass spectrometry Di-D-fructose dianhydrides as tracers of caramel authenticity. *J. Chromatogr. A* **844**, 283-293.
- ¹⁹ Real Decreto 2001/1995 de 7 de diciembre de 1995 por el que se aprueba la lista positiva de aditivos colorantes autorizados para su uso en la elaboración de productos alimenticios. BOE nº 19, 22-1-1990.
- ²⁰ Directiva 94/36/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 30 de junio de 1994 relativa a los colorantes utilizados en los productos alimenticios. DOCE nº 1237, 10-9-1994.
- ²¹ Mosedale, J. R. & Puech, J. L. (1998) Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Sci. & Technol.* **9**, 95-101.
- ²² Singleton, V.A. (1995) Maturation of wines and spirits: comparisons, facts and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**, 98-115.
- ²³ Dzhapoladyan, L. M., Mndzhoyan, E. L., Saakyan, R. G. & Akhnazaryan, F. A. (1969) Changes in the carbohydrates of oak fibres in an ethanol medium. *Vinodel. Vinograd. SSSR* **29**, 13-16.
- ²⁴ Lafon, J. (1971) Current problems of the technology and aging of brandies of wine and grape dregs. *Bull. Off. Int. Vigne Vin.* **44**, 339-355.
- ²⁵ Viriot, C., Scalbert, A., Lapiere, C. & Moutounet, M. (1993) Ellagitannins and lignins in aging of spirits in oak barrels. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 1872-1879.
- ²⁶ Belchior, A. P. & Carneiro, L. C. (1972) Identification of substances extracted from new wood of Limousin oak by spirits distilled from wine. *Conn. Vigne Vin.* **6**, 365-372.
- ²⁷ Reazin, G. H. (1981) Chemical mechanisms of whiskey maturation. *Am. J. Enol. Vitic.* **32**, 283-289.
- ²⁸ Black, R. A. & Andreasen, A. A. (1974) Gas-liquid chromatographic determination of monosaccharides and glycerol in aged distilled spirits. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **57**, 111-117.
- ²⁹ Hitos, P., Pons, A., Hinojosa, M. I. M., Lombardero, J., Camacho, S. & Dapena, P. (1995) Étude sur la caractérisation analytique du Brandy de Jerez. *Bulletin de LO. I. V.* **775-776**, 746-760.
- ³⁰ Blanco, D., Muro, D. & Mangas, J. J. (2003) Evolution of sugars in cider brandy aged in oak barrels: a contribution to its characterization. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 923-926.
- ³¹ Sato, K., Nakatsubo, F., Murakami, K. & Hattori, T. (1992) Sugar components in malt whisky I. Analysis by gas chromatography. *Mokuzai Gakkaishi* **38**, 608-611.
- ³² Sato, K., Nakatsubo, F., Kawamoto, H. & Murakami, K. (1992) Sugar components in malt whisky II. Liberation of monosaccharides during one year maturation. *Mokuzai Gakkaishi* **38**, 880-883.
- ³³ Sato, K., Nakatsubo, F., Kawamoto, H. & Murakami, K. (1994) Sugar components in malt whisky III. Liberation of monosaccharides and tannins during three years maturation. *Mokuzai Gakkaishi* **40**, 846-852.

- ³⁴ Cantagrel, R., Mazerolles, G., Vidal, J.P., Galy, B., Boulesteix, J.M., Lablanquie, O. & Gaschet, J. Evolution analytique et organoleptique des eaux-de-vie de Cognac au cours du vieillissement. 1^{ère} partie : Incidence des techniques de tonnelleres. 1^{er} Symposium Scientifique International de Cognac. Cognac (France), 1992.
- ³⁵ Bozhinov, A., Bakalov, V. & Balaanskii, V. (1984) Production of wine wood extract. *Lozar. Vinar.* **33**, 30-34.
- ³⁶ Sjöström, E. (1993) "Wood chemistry" 2^a ed., Academic Press, New York.
- ³⁷ Pettersen, R.C., Schwandt, V.H. & Effland, M.J. (1984) An analysis of the wood sugar assay using HPLC: a comparison with paper chromatography. *J. Chromatogr. Sci.* **22**, 478-484.
- ³⁸ Nykänen, L., Nykänen, I. & Moring, M. (1984) "Progress in Flavour Research" Elsevier, Amsterdam (The Netherlands).
- ³⁹ Presley, J. M. Determination of the sugars extracted from oak during maturation of brandy. Thesis. University of California, 1978.
- ⁴⁰ Del Alamo, M., Bernal, J. L., Del Nozal, M. J. & Gómez, C. (2000) Red wine aging in oak barrels: evolution of the monosaccharides content. *Food Chem.* **71**, 189-193.
- ⁴¹ Del Alamo, M., Bernal, J. L. & Gómez, C. (2000) Behavior of monosaccharides, phenolic compounds, and color of red wines aged in used oak barrels and in the bottle. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4613-4618.
- ⁴² Watts, V.A. & Butzke, C.E. (2003) Analysis of microvolatiles in brandy: relationship between methylketone concentration and cognac age. *J. Sci. Food Agric.* **83**, 1143-1149.
- ⁴³ Crowell, E.A. & Guymon, J.F. (1969) Studies of caprylic, capric, lauric and other free fatty acids in brandies by gas chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* **20**, 155-163.
- ⁴⁴ Ng, L.-K., Lafontaine, P. & Harnois, J. (2000) Gas chromatographic-mass spectrometric analysis of acids and phenols in distilled alcohol beverages. Application of anion-exchange disk extraction combined with in-vial elution and silylation. *J. Chromatogr. A* **873**, 29-38.
- ⁴⁵ Park, Y.J., Kim, K.R. & Kim, J.H. (1999) Gas chromatographic organic acid profiling analysis of brandies and whiskeys for pattern recognition analysis. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2322-2326.
- ⁴⁶ Trillo, L.M., Alvarez, M.A. & Arnedo, J. (1991) El coeficiente no alcohol en la evaluación de la calidad. *Vitivinicultura* **11-12**, 44-48.
- ⁴⁷ Guymon, J.F., Tolbert, N.E. & Amerine, M.A. (1943) Studies with brandy I. pH. *Food Res.* **8**, 224-230.
- ⁴⁸ Liebmann, A.J. & Scherl, B. (1949) Changes in whiskey while maturing. *Ind. Eng. Chem.* **41**, 534-543.
- ⁴⁹ Guymon, J.F. & Crowell, E.A. (1972) GC-separated brandy components derived from French and American oaks. *Am. J. Enol. Vitic.* **23**, 114-120.
- ⁵⁰ Onishi, M., Guymon, J.F. & Crowell, E.A. (1977) Changes in some volatile constituents of brandy during aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **28**, 152-158.
- ⁵¹ Panosyan, A.G., Mamikonyan, G.V., Torosyan, M., Gabrielyan, E.S., Mkhitarian, S.A., Tirakyan, M.R. & Ovanesyan, A. (2001) Determination of the composition of volatiles in cognac (Brandy) by Headspace Gas Chromatography- Mass Spectrometry. *J. Anal. Chem.* **56**, 945-952.

- ⁵² Câmpeanu, R., Ionescu, M. & Gavrilescu, I., Heroiu, E., Cotea, V. Evolution des divers constituants volatils et non volatils des eaux-de-vie de vin au cours de leur vieillissement en fûts de chêne. *1^{er} Symposium Scientifique International de Cognac*. Cognac (France), 1992.
- ⁵³ Egorov, I.A. & Rodopulo, A.K. (1994) Investigation of aroma-forming substances in cognac spirits and their aging process. *Appl. Biochem. & Microbiol.* **30**, 539-542.
- ⁵⁴ Webb, A.D. (1967) "Wine flavour: Volatile aroma components of wines. The chemistry and Physiology of Flavors" Schultz, H.W., Day, E.A. & Libbey, L.M. *Avi Publ. Co.*, Westport, Conn.
- ⁵⁵ Liebich, H.M., Koenig, W.A. & Bayer, E. (1970) Analysis of the flavor of rum by gas liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chrom. Sci.* **8**, 527-533.
- ⁵⁶ Fengel, D. & Wegener, G. (1989) Wood Chemistry, ultrastructure, reactions. Berlin, Walter de Gruyter & Co.
- ⁵⁷ Caldeira, I., Climaco, M.C. Bruno de Sousa, R. & Belchior, A.P. (2006) Volatile composition of oak and chestnut woods used in brandy ageing: Modification induced by heat treatment. *J. Food Eng.* **76**, 202-211.
- ⁵⁸ López, A. (1964) Contribución al estudio analítico de los coñacs, rones y whiskys del mercado español. *Anal. Bromatol.* **16**, 125-210.
- ⁵⁹ Bozhinov, A. & Bekalov, N. (1983) Oak extract in the aging of wine distillates. *Lozar. Vinar.* **32**, 21-24.
- ⁶⁰ Moutounet, M., Rabier, Ph., Puech, J.L., Verette, E. & Barillere, M. (1989) Analysis by HPLC of extractable substances of oak wood-application to a chardonnay wine. *Sci. Aliments* **9**, 35-51.
- ⁶¹ Pons, I., Garrault, C., Jaubert, J.N. & Morel, J. (1991) Analysis of aromatic caramel. *Food Chem.* **39**, 311-320.
- ⁶² Puech, J.L., Robert, A., Rabier, Ph. & Moutounet, M. (1988) Caractéristiques et dégradation physico-chimique de la lignine du bois de chêne (Characteristics and physicochemical degradation of lignin in oak wood) *Bull. Liaison Groupe polyphenols* **14**, 157-160.
- ⁶³ Jeurings, H.J. & Kupperts, F.J.E.M. (1980) High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**, 1215-1218.
- ⁶⁴ Quesada, J., Villalón, M., Lopez, H. & Lopez, M.C. (1996) Influence of aging factors on the furanic aldehyde contents of matured brandies-aging markers. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 1378-1381.
- ⁶⁵ Villalón, M., Quesada, J., Lopez, H. & Lopez, M.C. (1992) High performance liquid chromatography determination of furanic compounds in commercial brandies and caramels. *J. Liq. Chromatogr.* **15**, 513-524.
- ⁶⁶ Guichard, E., Fournier, N., Masson, G., Puech, J. (1995) Stereoisomers of β -methyl- γ -octalactone. I. Quantification in brandies as a function of wood origin and treatment of the barrels. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**, 419-423.
- ⁶⁷ Aylott, R.I., Clyne, A.H., Fox, A.P. & Walker, D.A. (1994) Analytical strategies to confirm Scotch Whisky authenticity. *Analyst* **119**, 1741-176.

- ⁶⁸ Schreier, P., Drawert, F. & Winkler, F. (1979) Composition of neutral volatile constituents in grape brandies. *J. Agric. Food Chem.* **27**, 365-372.
- ⁶⁹ Rodríguez, R., Blanco, D. & Mangas, J.J. (2003) Influence of distillation system, oak wood type, and aging time on volatile compounds of cider brandy. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 5709-5714.
- ⁷⁰ Masson, G., Guichard, E., Fournier, N., Puech, J. (1995) Stereoisomers of β -metil- γ -octalactone. II. Contents in the wood of French (*Quercus robur* and *Quercus petraea*) and American (*Quercus alba*) oaks. *Am. J. Enol. Vitic.* **46**, 424-428.
- ⁷¹ Álvarez, M.A., Trillo, L.M., Pinedo, J.M., Arnedo, R., Casas, J.A. & Sanz, J. Influencia del “envinado” en el perfil analítico del “Brandy de Jerez”. *XI Congreso Nacional de Enólogos*. Toledo, 2005.
- ⁷² Carrascal, V. Estudio de los ácidos orgánicos en Brandy de Jerez y su relación con las prácticas tradicionales de elaboración. *Tesis Doctoral*. Universidad de Cádiz, 2003.
- ⁷³ Martínez, C., Rodríguez, M. C., Guillén, D. A., Barroso, C. G. (2004) Analysis of low molecular weight carbohydrates in food and beverages: A review. *Chromatographia* **59**, 15-30.
- ⁷⁴ Mangas, J. J., Moreno, J., Rodríguez, R., Picinelli, A. & Suárez, B. (1999) Analysis of Polysaccharides in Cider: Their Effect on Sensory Foaming Properties. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 152-156.
- ⁷⁵ Jamin, E., Gonzalez, J., Remaud, G., Naulet, N., Martin, G. G., Weber, D., Rossmann, A. & Schmidt, H. L. (1997) Improved detection of sugar addition to apple juices and concentrates using internal standard ^{13}C IRMS. *Anal. Chim. Acta* **347**, 359-368.
- ⁷⁶ Day, M. P., Correia, P. & Hammond, D. A. (2001) ^{13}C -IRIS: an improved method to detect the addition of low levels of C4-derived sugars to juices. *Journal of AOAC Int.* **84**, 957-963.
- ⁷⁷ Cordella, C., Moussa, I., Martel, A. C., Sbirrazzuoli, N. & Lizzani-Cuvelier, L. (2002) Recent developments in food characterization and adulteration detection: technique-oriented perspectives. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1751-1764.
- ⁷⁸ Silva, B. M., Seabra, R. M., Andrade, P. B., Oliveira, M. B. & Ferreira, M. A. (1999) Adulteration of fruit juice by addition of sugars: A review. *Cienc. Tecnol. Aliment.* **2**, 184-191.
- ⁷⁹ Martin, G. G., Hanote, V., Lees, M. & Martin, Y. L. (1996) Interpretation of combined ^2H -SNIF/NMR and ^{13}C SIRA/MS analysis of fruit juices to detect added sugar. *J. AOAC Int.* **79**, 62-72.
- ⁸⁰ Martin, G.G., Wood, R. & Martin, G.J. (1996) Detection of added beet sugar in concentrated and single strength fruit juices by deuterium nuclear magnetic resonance (SNIF-NMR method): collaborative study. *J. AOAC Int.* **79**, 917-928.
- ⁸¹ Zhen, W. & Yi, C. (2001) Analysis of mono- and oligosaccharides by mutiawavelength surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy. *Carbohydr. Res.* **332**, 209-213.
- ⁸² Cooper, H. J. & Marshall, A. G. (2001) Electrospray ionization fourier transform mass spectrometric analysis of wine. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5710-5718.
- ⁸³ Thavarungkul, P., Suppapitnarm, P., Kanatharana, P. & Mattiasson, B. (1999) Batch injection analysis for the determination of sucrose in sugar cane juice using immobilized invertase and thermometric detection. *Biosensors & Bioelectronics* **14**, 19-25.

- ⁸⁴ Sosnitzer, P., Irtel, F., Ulber, R., Busse, M., Faurie, R., Fisher, L. & Scheper, T. (1998) Flow injection analysis system for the supervision of industrial chromatographic downstream processing in biotechnology. *Biosensors & Bioelectronics* **13**, 1251-1255.
- ⁸⁵ Weigel, B., Hitzmann, B., Kretzmer, G., Schügerl, K., Huwig, A. & Giffhorn, F. (1996) Analysis of various sugars by means of immobilized enzyme coupled flow injection analysis. *J. Biotechnol.* **50**, 93-106.
- ⁸⁶ Perdomo, J., Sundermeier, C., Hinkers, H., Martínez, O., Seifert, W. & Knoll, M. (1999) Containment sensors for the determination of L-lactate and glucose. *Biosensors & Bioelectronics* **14**, 27-32.
- ⁸⁷ Filipiak, M., Fludra, K. & Goszczynska, E. (1996) Enzymatic membranes for determination of some disaccharides by means of an oxygen electrode. *Biosensors & Bioelectronics* **11**, 355-364.
- ⁸⁸ Chemnitz, G. C., Erlenkötter, A., Frebel, H., Loechel, C., Meier, S., Olschewski, H., Röder, Y., Schneider, J. & Cammann, K. (1999) Disposable enzyme sensors for food analysis and clinical chemistry. *Química Analítica* **18**, 147-148.
- ⁸⁹ Sartini, R. P., Oliveira, C. C., Zagatto, E. A. G. & Bergamin, H. (1998) . Determination of reducing sugars by flow injection gravimetry. *Anal. Chim. Acta* **366**, 119-125.
- ⁹⁰ Kronka, E. A. M., Paim, A. P. S., Boaventura, F. R., Costa, J. L. F. & Lapa, R. A. (1999) Determination of glucose in soft drink and sugar-cane juice employing a multicommutation approach in flow system and enzymatic reaction. *Fresenius J Anal Chem* **364**, 358-361.
- ⁹¹ Sun, C., Zhang, X., Jiang, D., Gao, Q., Xu, H., Sun, Y., Zhang, X. & Shen, J. (1996) Electrocatalytic oxidation of carbohydrates at a molecular deposition film electrode based on water-soluble cobalt phthalocyanine and its application to flow-through detection. *J. Electroanal. Chem.* **411**, 73-78.
- ⁹² Coimbra, M. A., Barros, A., Barros, M., Rutledge, D. N. & Delgadillo, I. (1998) Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* **37**, 241-248.
- ⁹³ Fu, C., Song, L. & Yuzki, F. (1998) Simultaneous determination of sugars and organic acids by co-electroosmotic capillary electrophoresis with amperometric detection at a disk-shaped copper electrode. *Anal. Chim. Acta* **371**, 81-87.
- ⁹⁴ Tisza, S., Molnár-Perl, I., Friedman, M. & Sass, P. (1996) Simultaneous capillary GC of acids and sugars as their silyl(oxime) derivatives: quantitation of chlorogenic acid, raffinose, and pectin substances. *J. High Resolut. Chromatogr.* **19**, 54-58.
- ⁹⁵ Bassi, D., Bartolozzi, F. & Muzzi, E. (1996) Patterns and heritability of carboxylic acids and soluble sugars in fruits of apricot (*Prunus armeniaca* L). *Plant Breeding* **115**, 67-70.
- ⁹⁶ Lo Voi, A., Impembo, M., Fasanaro, G. & Castaldo, D. (1995) Chemical characterization of apricot puree. *J. Food Comp. Anal.* **8**, 78-85.
- ⁹⁷ Bartolozzi, F., Bertazza, G., Bassi, D. & Cristofori, G. (1997) Simultaneous determination of soluble sugars and organic acids as their trimethylsilyl derivatives in apricot fruits by gas-liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **758**, 99-107.
- ⁹⁸ Ratsimba, V., García, J. M., Defaye, J., Nigay, H. & Voilley, A. (1999) Qualitative and quantitative evaluation of mono- and disaccharides in D-fructose, D-glucose and sucrose caramels by gas-liquid chromatography-mass spectrometry Di-D-fructose dianhydrides as tracers of caramel authenticity. *J. Chromatogr. A* **844**, 283-293.

- ⁹⁹ Ayaz, F. A. & Bertoft, E. (2001) Sugar and phenolic acid composition of stored commercial Oleaster fruits. *J. Food Comp. Anal.* **14**, 505-511.
- ¹⁰⁰ Katona, Z. F., Sass, P. & Molnár-Perl, I. (1999) Simultaneous determination of sugars, sugar alcohols, acids and amino acids in apricots by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **847**, 91-102.
- ¹⁰¹ Molnár-Perl, I. & Horváth, K. (1997) Simultaneous Quantitation of Mono-, Di- and Trisaccharides as Their TMS Ether Oxime Derivatives by GC-MS: I. In Model Solutions. *Chromatographia* **45**, 321-327.
- ¹⁰² Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Ariño, A., Juan, T. & Herrera, A. (1995) Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chem.* **54**, 167-172.
- ¹⁰³ Low, N.H. (1996) Determination of fruit juice authenticity by capillary gas chromatography with flame ionization detection. *J. AOAC Int.* **79**, 724-737.
- ¹⁰⁴ Sanz, M.L., Villamiel, M. & Martínez-Castro, I. (2004) Inositols and carbohydrates in different fresh fruit juices. *Food Chem.* **87**, 325-328.
- ¹⁰⁵ Noe, C. R., Lachmann, B., Möllenbeck, S. & Richter, P. (1999) Determination of reducing sugars in selected beverages by capillary electrophoresis. *Z Lebensm Unters Forsch A* **208**, 148-152.
- ¹⁰⁶ Soga, T. & Serwe, M. (2000) Determination of carbohydrates in food samples by capillary electrophoresis with indirect UV detection. *Food Chem.* **69**, 339-344.
- ¹⁰⁷ Ye, J. & Baldwin, R. P. (1994) Determination of carbohydrates, sugar acids and alditols by capillary electrophoresis and electrochemical detection at a copper electrode. *J. Chromatogr. A* **687**, 141-148.
- ¹⁰⁸ Klockow, A., Paulus, A., Figueiredo, V., Amado, R. & Widmer, H. M. (1994) Determination of carbohydrates in fruit juices by capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **680**, 187-200.
- ¹⁰⁹ Chen, M. C. & Huang, H. J. (1997) Application of a nickel-microelectrode-incorporated end-column detector for capillary electrophoretic determination of alditols and alcohols. *Anal. Chim. Acta* **341**, 83-90.
- ¹¹⁰ Soga, T. & Heiger, D.N. (1998) Simultaneous Determination of Monosaccharides in Glycoproteins by Capillary Electrophoresis. *Anal. Biochem.* **261**, 73-78.
- ¹¹¹ Xu, X., Kok, W. T. & Poppe, H. (1995) Sensitive determination of sugars by capillary zone electrophoresis with indirect UV detection under highly alkaline conditions. *J. Chromatogr. A* **716**, 231-240.
- ¹¹² Zemann, A., Nguyen, D. T. & Bonn, G. (1997) Fast separation of underivatized carbohydrates by coelectroosmotic capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **18**, 1142-1147.
- ¹¹³ Noe, C. R. & Freissmuth, J. (1995) Capillary zone electrophoresis of aldose enantiomers: separation after derivatization with S-(-)-1-phenylethylamine. *J. Chromatogr. A* **704**, 503-512.
- ¹¹⁴ Woodward, C. & Weinberger, R. (1994) Capillary zone electrophoresis of carbohydrates derivatized with 4-aminobenzoic acid ethyl ester. *Hewlett Packard* **9**, 1-8.

- ¹¹⁵ Rydland, A. & Dahlman, O. (1996) Efficient capillary zone electrophoretic separation of wood-derived neutral and acidic mono- and oligosaccharides. *J. Chromatogr. A* **738**, 129-140.
- ¹¹⁶ Soga, T. & Imaizumi, M. (2001) Capillary electrophoresis method for the analysis of inorganic anions, organic acids, amino acids, nucleotides, carbohydrates and other anionic compounds. *Electrophoresis* **22**, 3418-3425.
- ¹¹⁷ Klampfl, C. W. & Buchberger, W. (2001) Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis with electrospray-mass spectrometric detection. *Electrophoresis* **22**, 2737-2742.
- ¹¹⁸ Suzuki, S., Shimotsu, N., Honda, S., Arai, A. & Nakanishi, H. (2001) Rapid analysis of amino sugars by microchip electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Electrophoresis* **22**, 4023-4031.
- ¹¹⁹ Cortacero-Ramírez, S., Segura-Carretero, A., Cruces-Blanco, C., Hernáinz-Bermúdez de Castro, M. & Fernández-Gutiérrez, A. (2004) Analysis of carbohydrates in beverages by capillary electrophoresis with precolumn derivatization and UV detection. *Food Chem.* **87**, 471-476.
- ¹²⁰ Brandolini, V., Menziani, E., Mazzotta, D., Cabras, P., Tosi, B. & Lodi, G. (1995) Use of AMD-HPTLC for carbohydrate monitoring in beers. *J. Food Comp. Anal.* **8**, 336-343.
- ¹²¹ Wei, Y. & Ding, M.-Y. (2000) Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* **904**, 113-117.
- ¹²² Yuan, J.-P. & Chen, F. (1999) Simultaneous separation and determination of sugars, ascorbic acid and furanic compounds by HPLC-dual detection. *Food Chem.* **64**, 423-427.
- ¹²³ López, E., Puig, M. A., Teixeira, E. & Buxaderas, S. (1996) Organic Acids, Sugars, and Glycerol Content in White Winemaking Products Determined by HPLC: Relationship to Climate and Varietal Factors. *Am. J. Enol. Vitic.* **47**, 193-197.
- ¹²⁴ Castellari, M., Versari, A., Spinabelli, U., Galassi, S. & Amati, A. (2000) An improved HPLC method for the analysis of organic acids, carbohydrates, and alcohols in grape musts and wines. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.* **23**, 2047-2056.
- ¹²⁵ Luo, P., Luo, M. Z. & Baldwin, R. P. (1993) Determination of Sugars in Food Products. *J. Chem. Educ.* **70**, 679-681.
- ¹²⁶ Huang, X., Pot, J. J. & Kok, W. T. (1995) Determination of Sugars by Liquid Chromatography and Amperometric Detection with a Cuprous Oxide Modified Electrode. *Chromatographia* **40**, 684-689.
- ¹²⁷ Akiyama, S., Nakashima, K. & Yamada, K. (1992) High-performance-chromatographic determination of sugars in an infusion and soft drinks using a silica-based 3-morpholinopropyl-bonded stationary phase. *J. Chromatogr.* **626**, 266-270.
- ¹²⁸ Gey, M. H., Unger, K. K. & Battermann, G. (1996) HPLC analysis of carbohydrates on POLYSPHER®CH OH columns using pulsed amperometric detection (PAD) with sodium hydroxide as post column detection reagent. *Fresenius J Anal Chem* **356**, 339-343.
- ¹²⁹ Mullin, W. J. & Emmons, D. B. (1997) Determination of organic acids and sugars in cheese, milk and whey by high performance liquid chromatography. *Food Res. Int.* **30**, 147-151.

- ¹³⁰ Mendes, E., Brojo, E., Ferreira, I. M. P. L. V. O. & Ferreira, M. A. (1998) Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydrate Polymers* **37**, 219-223.
- ¹³¹ Greenway, G. M. & Kometa, N. (1995) The determination of sugars in beverages and medicines using on-line dialysis for sample preparation. *Food Chem.* **53**, 105-110.
- ¹³² Nogueira, L.C., Silva, F., Ferreira, I.M.P.L.V.O. & Trugo, L.C. (2005) Separation and quantification of beer carbohydrates by high performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* **1065**, 207-210.
- ¹³³ Bruggink, C., Maurer, R., Herrmann, H., Cavalli, S. & Hoefler, F. (2005) Analysis of carbohydrates by anion exchange chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1085**, 104-109.
- ¹³⁴ Lehtonen, P. & Hurme, R. (1994) Liquid-chromatographic determination of sugars in beer by evaporative light-scattering detection. *J. Inst. Brew.* **100**, 343-346.
- ¹³⁵ Herbreteau, B., Lafosse, M., Morinallory, L. & Dreux, M. (1992) High-performance liquid-chromatography of raw sugars and polyols using bonded silica-gels. *Chromatographia* **33**, 325-330.
- ¹³⁶ Gotsick, J. T. & Benson, R. F. (1991) HPLC analysis of carbohydrates important to beer brewing using an aminopropyl stationary phase. *J. Liq. Chromatogr.* **14**, 1887-1901.
- ¹³⁷ Versari, A., Castellari, M., Parpinello, P., Riponi, C. & Galassi, S. (2002) Characterisation of peach juices obtained from cultivars Redhaven, Suncrest and Maria Marta grown in Italy. *Food Chem.* **76**, 181-185.
- ¹³⁸ Vérette, E., Qian, F. & Mangani, F. (1995) On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages. *J. Chromatogr. A* **705**, 195-203.
- ¹³⁹ Suzuki, J., Umeda, Y., Kondo, A. & Kato, I. (1992) Analysis of oligosaccharides by on-line high-performance liquid chromatography and ion-spray mass spectrometry. *Anal. Biochem.* **207**, 203-207.
- ¹⁴⁰ Yamamoto, A., Ohmi, H., Matsunaga, A., Ando, K., Hayakawa, K. & Nishimura, M. (1998) Selective determination of D-sorbitol and D-mannitol in foodstuffs by ion chromatography with polarized photometric detection. *J. Chromatogr. A* **804**, 305-309.
- ¹⁴¹ Rakotomanga, J., Baillet, A., Pellerin, F. & Baylocqferrier, D. (1992) Liquid-chromatographic analysis of monosaccharides with phenylisocyanate derivatization. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **10**, 587-591.
- ¹⁴² Indyk, H. E. & Woollard, D. C. (1994) Determination of free myoinositol in milk and infant formula by high-performance liquid chromatography. *Analyst* **119**, 397-402.
- ¹⁴³ Coquet, A., Haerdi, W., Degli, R. & Veuthey, J. L. (1994) Determination of sugars by liquid chromatography with post-column catalytic derivatization and fluorescence detection. *Chromatographia* **38**, 12-16.
- ¹⁴⁴ Masuda, R., Kaneko, K. & Yamashita, I. (1996) Sugar and cyclitol determination in vegetables by HPLC using postcolumn fluorescent derivatization. *J. Food Sci.* **61**, 1186-1190.
- ¹⁴⁵ Nojiri, S., Saito, K., Taguchi, N., Oishi, M. & Maki, T. (1999) Liquid chromatographic determination of sugar alcohols in beverages and foods after nitrobenzoylation. *J. AOAC Int.* **82**, 134-140.

- ¹⁴⁶ Blanco, D., Muro, D. & Mangas, J. (2001) Determination of monosaccharides in cider by reversed-phase liquid chromatography. *Anal. Chim. Acta* **436**, 173-180.
- ¹⁴⁷ Vendrell, S., Castellote, A. I. & López, M. C. (2000) Determination of inulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J. Chromatogr. A* **881**, 591-597.
- ¹⁴⁸ Rodríguez, M. D., Villanueva, M. J. & Redondo, A. (1999) Effects of processing conditions on soluble sugars content of carrot, beetroot and turnip. *Food Chem.* **66**, 81-85.
- ¹⁴⁹ Soufleros, E. H., Pissa, I., Petridis, D., Lygerakis, M., Mermelas, K., Boukouvalas, G. & Tsimitakis, E. (2001) Instrumental analysis of volatile and other compounds of Greek kiwi wine; sensory evaluation and optimisation of its composition. *Food Chem.* **75**, 487-500.
- ¹⁵⁰ Lu, B., Stefansson, M. & Westerlund, D. (1995) Indirect detection of saccharides in reversed-phase liquid-chromatography with highly alkaline mobile phases. *J. Chromatogr. A* **697**, 317-327.
- ¹⁵¹ Bouzas, J., Kantt, C. A., Bodyfelt, F. & Torres, J. A. (1991) Simultaneous determination of sugars and organic-acids in cheddar cheese by high-performance liquid-chromatography. *J. Food Sci.* **56**, 276-278.
- ¹⁵² Calull, M., López, E., Marcé, R. M., Olucha, J. C. & Borrull, F. (1992) Optimization of an ion-exchange high-performance liquid chromatographic method for the determination of carboxylic-acids, sugars, glycerol and ethanol in wines. *J. Chromatogr.* **589**, 151-158.
- ¹⁵³ Calull, M., Marcé, R. M. & Borrull, F. (1992) Determination of carboxylic acids, sugars, glycerol and ethanol in wine and grape must by ion-exchange high-performance chromatography with refractive-index detection. *J. Chromatogr.* **590**, 215-222.
- ¹⁵⁴ Doyon, G., Gaudreau, G., St-Gelais, D., Beaulieu, Y. & Randall, C. J. (1991) Simultaneous HPLC determination of organic acids, sugars and alcohols. *Can. Inst. Sci. Technol.* **24**, 87-94.
- ¹⁵⁵ López, E. F. & Gómez, E. F. (1996) Simultaneous determination of the major organic acids, sugars, glycerol, and ethanol by HPLC in grape musts and white wines. *J. Chromatogr. Sci.* **34**, 254-257.
- ¹⁵⁶ Mangas, J. J., Moreno, J., Picinelli, A. & Blanco, D. (1998) Characterization of Cider Apple Fruits According to Their Degree of Ripening. A Chemometric Approach. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 4174-4178.
- ¹⁵⁷ Picinelli, A., Suárez, B., Moreno, J., Rodríguez, R., Caso, L. M. & Mangas, J. J. (2000) Chemical Characterization of Asturian Cider. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 3997-4002.
- ¹⁵⁸ Chisholm, D. N. & Picha, D. H. (1986) Effect of storage temperature on sugar and organic acid contents of watermelon. *Hort Sci.* **21**, 1031-1033.
- ¹⁵⁹ Hunter, J. J., Visser, J. H. & Devilliers, O. T. (1991) Preparation of grapes and extraction of sugars and organic acids for determination by high-performance liquid-chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.* **42**, 237-244.
- ¹⁶⁰ Elkins, E. R., Lyon, R., Huang, C. J. & Matthys, A. (1997) Characterization of commercially produced pineapple juice concentrate. *J. Food Comp. Anal.* **10**, 285-298.
- ¹⁶¹ Chen, Z. L. & Hibbert, D. B. (1997) Simultaneous amperometric and potentiometric detection of sugars, polyols and carboxylic acids in flow systems using copper wire electrodes. *J. Chromatogr. A* **766**, 27-33.

- ¹⁶² Weston, R. J. & Brocklebank, L. K. (1999) The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. *Food Chem.* **64**, 33-37.
- ¹⁶³ Andersen, R. & Sørensen, A. (2000) Separation and determination of alditols and sugars by high-pH anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **897**, 195-204.
- ¹⁶⁴ Cataldi, T. R. I., Campa, C., Casella, I. G. & Bufo, S. A. (1999) Determination of Maltitol, Isomaltitol, and lactitol by High-pH Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 157-163.
- ¹⁶⁵ Casella, I. G., Guascito, M. R. & Cataldi, T. R. I. (1999) Electrocatalysis and amperometric detection of alditols and sugars at a gold-nickel electrode in anion-exchange chromatography. *Anal. Chim. Acta* **398**, 153-160.
- ¹⁶⁶ Corradini, C., Canali, G., Cogliandro, E. & Nicoletti, I. (1997) Separation of alditols of interest in food products by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **791**, 343-349.
- ¹⁶⁷ Bernal, J. L., Del Nozal, M. J., Toribio, L. & Del Alamo, M. (1996) HPLC analysis of carbohydrates in wines and instant coffees using anion exchange chromatography coupled to pulsed amperometric detection. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 507-511.
- ¹⁶⁸ Cataldi, T. R. I., Angelotti, M., D'Erchia, L., Altieri, G. & Di Renzo, G. C. (2003) Ion-exchange chromatography analysis of soluble cations, anions and sugars in milk whey. *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 75-82.
- ¹⁶⁹ Cataldi, T. R. I., Angelotti, M. & Bianco, G. (2003) Determination of mono- and disaccharides in milk and milk products by high-performance anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *Anal. Chim. Acta* **485**, 43-49.
- ¹⁷⁰ Dionex Corp. Analysis of fruit juice adulterated with medium invert sugar from beets. *Dionex Application Note* **82**, 1-4.
- ¹⁷¹ Tsang, W.S.C., Cargel, G.L.R. & Clarke, M.A. (1991) Ion chromatographic determination of raffinose in white sugar. *Proceedings of the Sugar Processing Research Conference* 368-380.
- ¹⁷² Tsang, W.S.C., Clarke, M.A. & Cargel, G.L.R. (1991) Identification of sweeteners in beverages. *Publication of Technical Papers and Proceedings of the Annual Meeting of Suga Industry Technologists* **50**, 13-25.
- ¹⁷³ Yan, Z., Xingde, Z. & Weijun, N. (1997) Simultaneous Determination of Carbohydrates and Organic Acids in Beer and Wine by Ion Chromatography. *Mikrochim. Acta* **127**, 189-194.
- ¹⁷⁴ Wang, J., Sporns, P. & Low, N. H. (1999) Analysis of food oligosaccharides using MALDI-MS: quantification of fructooligosaccharides. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1549-1557.
- ¹⁷⁵ Goodall, I., Dennis, M. J., Parker, I. & Sharman, M. (1995) Contribution of high-performance liquid chromatography analysis of carbohydrates to authenticity testing of honey. *J. Chromatogr. A* **706**, 353-359.
- ¹⁷⁶ Kakemoto, M., Murakami, K. & Ogawa, H. (1996) Simultaneous determination of ethanol and glucose by HPLC with an immobilized enzyme membrane electrode. *Nippon Kagaku Kaishi* 141-145.

- ¹⁷⁷ LaCourse, W. R., Dasenbrock, C. O. & Zook, C. M. (1997) Fundamentals and applications of pulsed electrochemical detection in food analysis. *Sem. Food Anal.* **2**, 5-41.
- ¹⁷⁸ Cataldi, T. R. I., Margiotta, G. & Zambonin, C. G. (1998) Determination of sugars and alditols in food samples by HPAEC with integrated pulsed amperometric detection using alkaline eluents containing barium or strontium ions. *Food Chem.* **62**, 109-115.
- ¹⁷⁹ Cataldi, T. R. I., Angelotti, M. & Bufo, S. A. (1999) Method development for the quantitative determination of lactulose in heat-treated milks by HPAEC with pulsed amperometric detection. *Anal. Chem.* **71**, 4919-4925.
- ¹⁸⁰ Van Riel, J. & Olieman, C. (1991) Selectivity control in the anion-exchange chromatographic determination of saccharides in dairy products using pulsed amperometric detection. *Carbohydr. Res.* **215**, 39-46.
- ¹⁸¹ Swallow, K. W. & Low, N. H. (1990) Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high-performance liquid chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **38**, 1828-1832.
- ¹⁸² Low, N. H. & Wudrich, G. G. (1993) Detection of inexpensive sweetener addition to grapefruit juice by HPLC-PAD. *J. Agric. Food Chem.* **41**, 902-909.
- ¹⁸³ Désèveaux, S., Daems, V., Delvaux, F. & Derdelinckx. (1997) Analysis of fermentable sugars and dextrins in beer by anion exchange chromatography with electrochemical detection. *Sem. Food Anal.* **2**, 113-117.
- ¹⁸⁴ Corradini, C., Canali, G. & Nicoletti, I. (1997) Application of HPAEC-PAD to carbohydrate analysis in food products and fruit juices. *Sem. Food Anal.* **2**, 99-111.
- ¹⁸⁵ Eggleston, G. & Clarke, M. A. (1997) Applications of HPAE-PAD in the sugar industry. *Sem. Food Anal.* **2**, 119-127.
- ¹⁸⁶ Hammond, D. A. (2001) Synergy between liquid chromatographic-pulsed amperometric detection and capillary-gas chromatographic methods for the detection of juice adulteration. *J. AOAC Int.* **84**, 964-975.
- ¹⁸⁷ Baldwin, R. P. (1999) Electrochemical determination of carbohydrates: Enzyme electrodes and amperometric detection in liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **19**, 69-81.
- ¹⁸⁸ Johnson, D. C. & LaCourse, W. R. (1990) Liquid chromatography with pulsed electrochemical detection at gold and platinum electrodes. *Anal. Chem.* **62**, 589-597.
- ¹⁸⁹ Cataldi, T. R. I., Campa, C. & De Benedetto, G. E. (2000) Carbohydrate analysis by high-performance anion-exchange chromatography with pulsed amperometric detection: the potential is still growing. *Fresenius J Anal Chem* **368**, 739-758.
- ¹⁹⁰ Swallow, K. W., Low, N. H. & Petrus, D. R. (1991) Detection of orange juice adulteration with beet medium invert sugar using anion-exchange liquid chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **74**, 341-345.
- ¹⁹¹ Zidková, J. & Chmelík, J. (2001) Determination of saccharides in fruit juices by capillary electrophoresis and matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **36**, 417-421.
- ¹⁹² Rocklin, R. D. & Pohl, C. A. (1983) Determination of carbohydrates by anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Liq. Chromatogr.* **6**, 1577-1590.

-
- ¹⁹³ Mehrländer, K., Dietrich, H., Sembries, S., Dongowski, G. & Will, F. (2002) Structural characterization of oligosaccharides and polysaccharides from apple juices produced by enzymatic pomace liquefaction. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 1230-1236.
- ¹⁹⁴ Dionex Corp. Analysis of carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). *Dionex Technical Note* **20**, 1-13.
- ¹⁹⁵ Hughes, S. & Johnson, D.C. (1982) High-performance liquid chromatographic separation with triple-pulse amperometric detection of carbohydrates in beverages. *J. Agric. Food Chem.* **30**, 712-714.
- ¹⁹⁶ Hughes, S. & Johnson, D. C. (1981) Amperometric detection of simple carbohydrates at platinum electrodes in alkaline solutions by application of a triple-pulse potential waveform. *Anal. Chim. Acta* **132**, 11-22.
- ¹⁹⁷ Edwards, P. & Haak, K. K. (1983) *Int. Lab.* **38**, Junio.
- ¹⁹⁸ Colón, L. A., Dadoo, R. & Zare, R. N. (1993) Determination of carbohydrates by capillary zone electrophoresis with amperometric detection at a cooper microelectrode. *Anal. Chem.* **65**, 476-481.
- ¹⁹⁹ Ye, J. & Baldwin, R.P. (1993) Amperometric detection in capillary electrophoresis with normal size electrodes. *Anal. Chem.* **65**, 3525-3527.
- ²⁰⁰ Fermier, A. M., Gostkowski, M. L. & Colon, L. A. (1996) Rudimentary capillary-electrode alignment for capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Anal. Chem.* **68**, 1661-1664.
- ²⁰¹ Voegel, P. D., Zhou, W. & Baldwin, R. P. (1997) Integrated capillary electrophoresis/electrochemical detection with metal film electrodes directly deposited onto the capillary tip. *Anal. Chem.* **69**, 951-957.
- ²⁰² Fermier, A. M. & Colon, L. A. (1996) Capillary electrophoresis with constant potential amperometric detection using a nickel microelectrode for the detection of carbohydrates. *J. High Resolut. Chromatogr.* **19**, 613-616.
- ²⁰³ O'Shea, T. J. & Lunte, S. M. (1994) Chemically modified microelectrodes for capillary electrophoresis/electrochemistry. *Anal. Chem.* **66**, 307-311.
- ²⁰⁴ Huang, X. & Kok, W. T. (1995) Determination of sugars by capillary electrophoresis with electrochemical detection using cuprous oxide modified electrodes. *J. Chromatogr. A* **707**, 335-342.
- ²⁰⁵ Lu, W. & Cassidy, R. M. (1993) Pulsed amperometric detection of carbohydrates separated by capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **65**, 2878-2881.
- ²⁰⁶ LaCourse, W. R. & Owens, G. S. (1996) Pulsed electrochemical detection of nonchromophoric compounds following capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **17**, 310-318.
- ²⁰⁷ Zhong, M. & Lunte, S. M. (1996) Integrated on-capillary electrochemical detector for capillary electrophoresis. *Anal. Chem.* **68**, 2488-2493.
- ²⁰⁸ Anklam, E. (1998) A review of the analytical methods to determine the geographical and botanical origin of honey. *Food Chem.* **63**, 549-562.
- ²⁰⁹ Berger, A., Brühlhart, M. & Prodolliet, J. (1991) Detection of adulteration in pure soluble coffee by enzymatic sugar determination. *Lebensm Wiss Technol* **37**, 926-930.

- ²¹⁰ Silverstein, R.M., Bassler, G.C. & Morrill, T.C. (1991) "Spectrometric identification of organic compounds" 5th ed., Wiley, Nueva York, E.E.U.U.
- ²¹¹ Urtubia, A., Pérez-Correa, R., Meurens, M. & Agosin, E. (2004) Monitoring large scale wine fermentations with infrared spectroscopy. *Talanta* **64**, 778-784.
- ²¹² Nieuwoudt, H.H., Prior, B.A., Pretorius, I.S., Manley, M. & Bauer, F.F. (2004) Principal component analysis applied to Fourier transform infrared spectroscopy for the design of calibration sets for glycerol prediction models in wine and for the detection and classification of outlier samples. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3726-3735.
- ²¹³ Rambla, F.J., Garrigues, S. & de la Guardia, M. (1997) PLS-NIR determination of total sugar, glucose, fructose and sucrose in aqueous solutions of fruit juices. *Anal. Chim. Acta* **344**, 41-53.
- ²¹⁴ Rodríguez-Saona, L. E., Fry, F. S., McLaughlin, M. A. & Calvey, E. M. (2001) Rapid analysis of sugars in fruit juices by FT-NIR spectroscopy. *Carbohydr Res* **336**, 63-74.
- ²¹⁵ Gestal, M., Gómez-Carracebo, M.P., Andrade, J.M., Dorado, J., Fernández, E., Prada, D. & Pazos, A. (2004) Classification of apple beverages using artificial neural networks with previous variable selection. *Anal. Chim. Acta* **524**, 225-234.
- ²¹⁶ Vonach, R., Lendl, B. & Kellner, R. (1998) High-performance liquid chromatography with real-time Fourier-transform infrared detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in wines. *J. Chromatogr. A* **824**, 159-167.
- ²¹⁷ Edelmann, A., Diewok, J., Rodríguez, J. & Lendl, B. (2003) High-performance liquid chromatography with diamond ATR-FTIR detection for the determination of carbohydrates, alcohols and organic acids in red wine. *Anal. Bioanal. Chem.* **376**, 92-97.
- ²¹⁸ Roussel, S., Bellon-Maurel, V., Roger, J.M. & Grenier, P. (2003) Authenticating white grape must variety with classification models based on aroma sensors, FT-IR and UV spectroscopy. *J. Food Eng.* **60**, 407-419.
- ²¹⁹ Kupina, S.A. & Shrikhande, A.J. (2003) Evaluation of a Fourier transform infrared instrument for rapid quality-control wine analyses. *Am. J. Enol. Vitic.* **54**, 131-134.
- ²²⁰ Edelmann, A., Ruzicka, C., Frank, J., Lendl, B., Schrenk, W., Gornik, E. & Strasser, G. (2001) Towards functional group-specific detection in high-performance liquid chromatography using mid-infrared quantum cascade lasers. *J. Chromatogr. A* **934**, 123-128.
- ²²¹ Qiu, P.Y., Ding, H.B., Tang, Y.K. & Xu, R.J. (1999) Determination of chemical composition of commercial honey by near infrared spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 2760-2765.
- ²²² Vonach, R., Lendl, B. & Kellner, R. (1997) Hyphenation of ion exchange high-performance liquid chromatography with Fourier transform infrared detection for the determination of sugars in non-alcoholic beverages. *Anal. Chem.* **69**, 4286-4290.
- ²²³ Gallignani, M., Garrigues, S. & de la Guardia, M. (1993) Direct determination of ethanol in all types of alcoholic beverages by near-infrared derivative spectrometry. *Analyst* **118**, 1167-1173.
- ²²⁴ LeThanh, H. & Lendl, B. (2000) Sequential injection Fourier transform infrared spectroscopy for the simultaneous determination of organic acids and sugars in soft drinks employing automated solid phase extraction. *Anal. Chim. Acta* **422**, 63-69.

- 225 Bellanato, J. & Bravo-Abad, F. (1988) Análisis de componentes del brandy por espectroscopia infrarroja *Rev. Agroquím. Tecnol. Aliment.* **28**, 379-394.
- 226 Tipparat, P., Lapanantnoppakhun, S., Jakmunee, J. & Grudpan, K. (2001) Determination of ethanol in liquor by near-infrared spectrophotometry with flow injection. *Talanta* **53**, 1199-1204.
- 227 Schindler, R., Vonach, R., Lendl, B. & Kellner, R. (1998) A rapid automated method for wine analysis based upon sequential injection (SI)-FTIR spectrometry. *Fresenius J. Anal. Chem.* **362**, 130-136.
- 228 Pérez-Ponce, A., Garrigues, S. & de la Guardia, M. (1996) Vapour generation-Fourier transform infrared direct determination of ethanol in alcoholic beverages. *Analyst* **121**, 923-928.
- 229 Pérez-Ponce, A., Rambla, F.J., Garrigues, J.M., Garrigues, S. & de la Guardia, M. (1998) Partial least-squares-Fourier transform infrared spectrometric determination of methanol and ethanol by vapour-phase generation. *The Analyst* **123**, 1253-1258.
- 230 Garrigues, S., Rambla, F. J. & de la Guardia, M. (1998) Comparative study of reflectance cells for PLS-FTIR determination of sugars in soft drinks. *Fresenius. J. Anal. Chem.* **362**, 137-140.
- 231 Patz, C.D., Blieke, A., Ristow, R. & Dietrich, H. (2004) Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Anal. Chim. Acta* **513**, 81-89.
- 232 Fu, X., Yan, G., Chen, B. & Li, H. (2005) Application of wavelet transforms to improve prediction of near infrared spectra. *J. Food Eng.* **69**, 461-466.
- 233 Barboza, F.D. & Poppi, R.J. (2003) Determination of alcohol content in beverages using short-wave near-infrared spectroscopy and temperature correction by transfer calibration procedures. *Anal. Bioanal. Chem.* **377**, 695-701.
- 234 Van den Berg, F.W.J., Van Osenbruggen, W.A. & Smilde, A.K. (1997) Process analytical chemistry in the distillation industry using near-infrared spectroscopy. *Process Control and Quality* **9**, 51-57.
- 235 Pontes, M.J.C., Santos, S.R.B., Araújo, M.C.U., Almeida, L.F., Lima, R.A.C., Gaião, E.N. & Souto, U.T.C.P. (2006) Classification of distilled alcoholic beverages and verification of adulteration by near infrared spectroscopy. *Food Res. Int.* **39**, 182-189.
- 236 Reid, L.M., Woodcock, T., O'Donnell, C.P., Kelly, J.D. & Downey, G. (2005) Differentiation of apple juice samples on the basis of heat treatment and variety using chemometric analysis of MIR and NIR data. *Food Res.Int.* **38**, 1109-1115.
- 237 Roussel, S., Bellon-Maurel, V., Roger, J.-M. & Grenier, P. (2003) Fusion of aroma, FT-IR and UV sensor data based on the Bayesian inference. Application to the discrimination of white grape varieties. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **65**, 209-219.
- 238 Llario, R., Iñón, F.A., Garrigues, S. & De La Guardia (2006) Determination of quality parameters of beers by the use of attenuated total reflectance-Fourier transform infrared spectroscopy. *Talanta* **69**, 469-480.
- 239 Tewari, J. & Irudayaraj, J. (2004) Quantification of saccharides in multiple floral honeys using Fourier Transform infrared microattenuated total reflectance spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 3237-3243.
- 240 Urbano-Cuadrado, M., Luque de Castro, M.D., Pérez-Juan, P.M., García-Olmo, J. & Gómez-Nieto, M.A. (2004) Near infrared reflectance spectroscopy and multivariate

-
- analysis in enology. Determination or screening of fifteen parameters in different types of wines. *Anal. Chim. Acta* **527**, 81-88.
- ²⁴¹ Palma, M. & Barroso, C.G. (2002) Application of FT-IR spectroscopy to the characterisation and classification of wines, brandies and other distilled drinks. *Talanta* **58**, 265-271.
- ²⁴² Damberg, R.G., Kambouris, A., Francis, I.L. & Gishen, M. (2002) Rapid analysis of methanol in grape-derived distillation products using near-infrared transmission spectroscopy *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3079-3084.
- ²⁴³ Moreira, J.L. & Santos, L. (2004) Spectroscopic interferences in Fourier transform infrared wine analysis. *Anal. Chim. Acta* **513**, 263-268.
- ²⁴⁴ Mendes, L.S., Oliveira, F.C.C., Suarez, P.A.Z. & Rubim, J.C. (2003) Determination of ethanol in fuel ethanol and beverages by Fourier transform (FT)-near infrared and FT-Raman spectrometries. *Anal. Chim. Acta* **493**, 219-231.
- ²⁴⁵ Picinelli, A., Suárez, B., Fernández, N., Rodríguez, R. & Fernández, O. (2006) Calibration models for routine analysis of cider by mid-infrared spectroscopy. *LWT* **39**, 1026-1032.
- ²⁴⁶ Cozzolino, D., Smyth, H.E., Lattey, K.A., Cynkar, W., Janik, L., Damberg, R.G., Francis, I.L. & Gishen, M. (2006) Combining mass spectrometry based electronic nose, visible-near infrared spectroscopy and chemometrics to assess the sensory properties of Australian Riesling wines. *Anal. Chim. Acta* **563**, 319-324.
- ²⁴⁷ Cozzolino, D., Smyth, H.E., Lattey, K.A., Cynkar, W., Janik, L., Damberg, R.G., Francis, I.L. & Gishen, M. (2005) Relationship between sensory analysis and near infrared spectroscopy in Australian Riesling and Chardonnay wines. *Anal. Chim. Acta* **539**, 341-348.
- ²⁴⁸ García-Jares, C.M. & Medina, B. (1997) Application of multivariate calibration to the simultaneous routine determination of ethanol, glycerol, fructose, glucose and total residual sugars in botrytized-grape sweet wines by means of near-infrared reflectance spectroscopy. *Fresenius J. Anal. Chem.* **357**, 86-91.
- ²⁴⁹ Osborne, B.G., Fearn, T. & Hindle, P.H. (1993) "Practical NIR Spectroscopy with Application in Food and Beverage Analysis" *Longman Scientific & Technical*, Harlow, U.K.
- ²⁵⁰ Kahle, K., Preston, C., Richling, E., Heckel, F. & Schreier, P. (2005) On-line gas chromatography combustion/pyrolysis isotope ratio mass spectrometry (HRGC-C/P-IRMS) of major volatiles from pear fruit (*Pyrus communis*) and pear products. *Food Chem.* **91**, 449-455.
- ²⁵¹ Ferrari, G., Lablanquie, O., Cantagrel, R., Ledauphin, J., Payot, T., Fournier, N. & Guichard, E. (2004) Determination of key odorant compounds in freshly distilled cognac using GC-O, GC-MS, and sensory evaluation. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5670-5676.
- ²⁵² Caldeira, I., Pereira, R., Clímaco, M.C., Belchior, A.P. & Bruno de Sousa, R. (2004) Improved method for extraction of aroma compounds in aged brandies and aqueous alcoholic wood extracts using ultrasound. *Anal. Chim. Acta* **513**, 125-134.
- ²⁵³ Waterhouse, A.L. & Towey, J.P. (1994) Oak lactone isomer ratio distinguishes between wines fermented in American and French oak barrels. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1971-1974.
- ²⁵⁴ Ortega-Heras, M., González-Huerta, C., Herrera, P. & González-Sanjosé, M.L. (2004) Changes in wine volatile compounds of varietal wines during ageing in wood barrels. *Anal. Chim. Acta* **513**, 341-350.

- 255 Pérez-Prieto, L.J., López-Roca, J.M. & Gómez-Plaza, E. (2003) Differences in mayor volatile compounds of red wines according to storage length and storage conditions. *J. Food Comp. Anal.* **16**, 697-705.
- 256 Selli, S., Canbas, A., Cabaroğlu, T., Erten, H. & Gütana, Z. (2006) Aroma components of cv. Muscat of Bornova wines and influence of skin contact treatment. *Food Chem.* **94**, 319-326.
- 257 Ledauphin, J., Basset, B., Cohen, S., Payot, T. & Barillier, D. (2006) Identification of trace volatile compounds in freshly distilled calvados and cognac: carbonyl and sulphur compounds. *J. Food Comp. Anal.* **19**, 28-40.
- 258 Garde, T. & Ancín-Azpilicueta, C. (2006) Effect of oak barrel type on the volatile composition of wine: storage time optimization. *LWT* **39**, 199-205.
- 259 Guichard, H., Lemesle, S., Ledauphin, J., Barrillier, D. & Picoche, B. (2003) Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled Calvados. 1. Evaluation of quality and defects on the basis of key odorants by olfactometry and sensory analysis. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 424-432.
- 260 Ledauphin, J., Guichard, H., Saint-Clair, J.F., Picoche, B. & Barillier, D. (2003) Chemical and sensorial aroma characterization of freshly distilled Calvados. 2. Identification of volatile compounds and key odorants. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 433-442.
- 261 Ebeler, S.E., Terrien, M.B. & Butzke, C.E. (2000) Analysis of brandy aroma by solid-phase microextraction and liquid-liquid extraction. *J. Sci. Food Agric.* **80**, 625-630.
- 262 Moreno, J.A., Zea, L., Moyano, L. & Medina, M. (2005) Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Cont.* **16**, 333-338.
- 263 Ledauphin, J., Saint-Clair, J.-F., Lablanquie, O., Guichard, H., Fournier, N., Guichard, E. & Barillier, D. (2004) Identification of trace volatile compounds in freshly distilled Calvados and Cognac using preparative separations coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 5124-5134.
- 264 Elss, S., Preston, C., Hertzog, C., Heckel, F., Richling, E. & Schreier, P. (2005) Aroma profiles of pineapple fruit (*Ananas comosus* [L.] Merr.) and pineapple products. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **38**, 263-274.
- 265 Fernández-García, T., Martín, M.E. & Casp, A. (1998) Quantification of significant volatile components of pacharán. *Z Lebensm Unters Forsch A* **206**, 414-416.
- 266 Garde, T., Rodríguez, S., Ancín, C. (2002) Volatile composition of aged wine in used barrels of French oak and of American oak. *Food Res. Int.* **35**, 603-610.
- 267 Tønder, D., Petersen, M.A., Poll, L. & Olsen, C.E. (1998) Discrimination between freshly made and stored reconstituted orange juice using GC odour profiling and aroma values. *Food Chem.* **61**, 223-229.
- 268 Castro, R., Natera, R., Benítez, P. & Barroso, C.G. (2004) Comparative analysis of volatile compounds of “fino” sherry wine by rotatory and continuous liquid-liquid extraction and solid-phase microextraction in conjunction with gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta* **513**, 141-150.
- 269 Lau, M.N., Ebeler, J.D. & Ebeler, S.E. (1999) Gas chromatographic analysis of aldehydes in alcoholic beverages using a cysteamine derivatization procedure. *Am. J. Enol. Vitic.* **50**, 324-333.

- 270 Mangas, J., Rodríguez, R., Moreno, J. & Blanco, D. (1996) Volatiles in distillates of cider aged in American oak wood. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 268-273.
- 271 Escudero, A., Asensio, E., Cacho, J. & Ferreira, V. (2002) Sensory and chemical changes of young white wines stored under oxygen. An assessment of the role played by aldehydes and some other important odorants. *Food Chem.* **77**, 325-331.
- 272 Señoráns, F.J., Ruiz-Rodríguez, A., Ibáñez, E., Tabera, J. & Reglero, G. (2003) Isolation of brandy aroma by countercurrent supercritical fluid extraction. *J. Supercrit. Fluids* **26**, 129-135.
- 273 Blanch, G.P., Reglero, G. & Herraiz, M. (1995) Analysis of wine aroma by off-line and on-line supercritical fluid extraction-gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 1251-1258.
- 274 Ferreira do Nascimento, R.; Cardoso, D.R., Lima Neto, B.S. & Franco, D.W. (1998) Determination of acids in brazilian sugar cane spirits and other alcoholic beverages by HRGC-SPE. *Chromatographia* **48**, 751-757.
- 275 Diéguez, S.C., Díaz, L.D., De La Peña, M.L.G. & Gómez, E.F. (2002) Variation of volatile organic acids in spirits during storage at low and room temperature. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **35**, 452-457.
- 276 Hida, Y., Kudo, K., Nishida, N. & Ikeda, N. (2001) Identification of reddish alcoholic beverages by GC/MS using aroma components as indicators. *Legal Med.* **3**, 237-240.
- 277 Escalona, H., Birkmyre, L., Piggott, J.R. & Paterson, A. (2002) Effect of maturation in small oak casks on the volatility of red wine aroma compounds. *Anal. Chim. Acta* **458**, 45-54.
- 278 Wada, K. & Shibamoto, T. (1997) Isolation and identification of volatile compounds from a wine using Solid-Phase Extraction, gas chromatography, and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 4362-4366.
- 279 Diéguez, S.C., Díaz, L.D., De La Peña, M.L.G. & Gómez, E.F. (2003) Approaches to spirit aroma: contribution of some aromatic compounds to the primary aroma in samples of Orujo spirits. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7385-7390.
- 280 Piñeiro, Z., Palma, M. & Barroso, C.G. (2004) Determination of terpenoids in wines by solid phase extraction and gas chromatography. *Anal. Chim. Acta* **513**, 209-214.
- 281 Domínguez, C., Guillén, D.A. & Barroso, C.G. (2002) Determination of volatile phenols in fino sherry wines. *Anal. Chim. Acta* **458**, 95-102.
- 282 Piñeiro, Z., Natera, R., Castro, R., Palma, M., Puertas, B. & Barroso, C.G. (2006) Characterisation of volatile fraction of monovarietal wines: Influence of winemaking practices. *Anal. Chim. Acta* **563**, 165-172.
- 283 Selli, S., Cabaroğlu, T. & Canbas, A. (2004) Volatile flavour components of orange juice obtained from the cv. Kozan of Turkey. *J. Food Comp. Anal.* **17**, 789-796.
- 284 Deng, C. (1997) Determination of total organic acids in wine by interfacial derivatization gas chromatographic method. *Se Pu.* **15**, 505-507.
- 285 Ledauphin, J., Barillier, D. & Beljean-Leymarie, M. (2006) Gas chromatographic quantification of aliphatic aldehydes in freshly distilled calvados and cognac using 3-methylbenzothiazolin-2-one hydrazone as derivative agent. *J. Chromatogr. A* **1115**, 225-232.

- ²⁸⁶ Nedjma, M. (1997) Influence of complex media composition, cognac's brandy, or cognac, on the gas chromatography analysis of volatile sulfur compounds – Preliminary results of the matrix effect. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 333-338.
- ²⁸⁷ Nedjma, M. & Maujean, A. (1995) Improved chromatographic analysis of volatile sulfur compounds by the static headspace technique on water-alcohol solutions and brandies with chemiluminescence detection. *J. Chromatogr. A* **704**, 495-502.
- ²⁸⁸ González-Arjona, D., González-Gallero, V., Pablos, F. & González, A.G. (1999) Authentication and differentiation of Irish whiskeys by higher-alcohol congener analysis. *Anal. Chim. Acta* **381**, 257-264.
- ²⁸⁹ Gómez-Ariza, J.L. & García-Barrera, T. & Lorenzo, F. (2004) Determination of flavour and off-flavour compounds in orange juice by on-line coupling of a pervaporation unit to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1047**, 313-317.
- ²⁹⁰ Fitzgerald, G., James, K.J., MacNamara, K. & Stack, M.A. (2000) Characterisation of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **896**, 351-359.
- ²⁹¹ Demyttenaere, J.C.R., Sánchez, J.I., Verhé, R., Sandra, P., & Kimpe, N.D. (2003) Analysis of volatiles of malt whisky by solid-phase microextraction and stir bar sorptive extraction. *J. Chromatogr. A* **985**, 221-232.
- ²⁹² Pino, J., Martí, M.P., Mestres, M., Pérez, J., Busto, O. & Guasch, J. (2002) Headspace solid-phase microextraction of higher fatty acid ethyl esters in white rum aroma. *J. Chromatogr. A* **954**, 51-57.
- ²⁹³ Watts, V.A., Butzke, C.E. & Boulton, B. (2003) Study of aged cognac using solid-phase microextraction and partial least-squares regression. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 7738-7742.
- ²⁹⁴ Aguilar-Cisneros, B.O., López, M.G., Richling, E., Heckel, F. & Schreier, P. (2002) Tequila authenticity assessment by headspace SPME-HRGC-IRMS analysis of ¹³C/¹²C and ¹⁸O/¹⁶O ratios of ethanol. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7520-7523.
- ²⁹⁵ Wardencki, W., Sowinski, P. & Curylo, J. (2003) Evaluation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile carbonyl compounds in spirits and alcoholic beverages. *J. Chromatogr. A* **984**, 89-96.
- ²⁹⁶ Nonato, E.A., Carazza, F., Silva, F.C., Carvalho, C.R. & Cardeal, Z.L. (2001) A headspace solid-phase microextraction method for the determination of some secondary compounds of brazilian sugar cane spirits by gas chromatography. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 3533-3539.
- ²⁹⁷ Da Porto, C., Pizzale, L., Bravin, M., Conte, L.S. (2003) Analyses of orange spirit flavour by direct injection-gas chromatography-mass spectrometry and headspace solid-phase microextraction/GC-MS. *Flavour Frag. J.* **18**, 66-72.
- ²⁹⁸ Da Porto, C., Cordaro, F. & Marcassa, N. (2006) Effects of carbohydrate and noncarbohydrate sweeteners on the orange spirit volatile compounds. *LWT* **39**, 159-165.
- ²⁹⁹ Rodríguez-Bencomo, J.J., Conde, J.E., García-Montelongo, F. & Perez-Trujillo, J.P. (2003) Determination of major compounds in sweet wines by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *J. Chromatogr. A* **991**, 13-22.
- ³⁰⁰ Vas, G.Y., Koteleky, K., Farkas, M., Dobo, A. & Vekey, K. (1998) Fast screening method for wine headspace compounds using solid-phase microextraction (SPME) and capillary GC technique. *Am. J. Enol. Vitic.* **49**, 100-104.

- 301 Alves, R.F., Nacimient, A.M.D. & Nogueira, J.M.F. (2005) Characterization of the aroma profile of Madeira wine by sorptive extraction techniques. *Anal. Chim. Acta* **546**, 11-21.
- 302 Castro, R., Natera, R., García, M.V. & Barroso, C.G. (2003) Optimisation of headspace solid-phase microextraction for the analysis of volatile phenols in wine. *J. Chromatogr. A* **995**, 11-20.
- 303 Castro, R., Natera, R., García, M.V. & Barroso, C.G. (2002) Optimisation of headspace solid-phase microextraction for analysis of aromatic compounds in vinegar. *J. Chromatogr. A* **953**, 7-15.
- 304 Natera, R., Castro, R., García, M.V., Rowe, F. & Barroso, C.G. (2002) Headspace solid-phase microextraction analysis of aroma compounds in vinegar. Validation study. *J. Chromatogr. A* **967**, 261-267.
- 305 Jelén, H.H., Wlazly, K., Wasowicz, E., Kamiski, E. (1998) Solid-phase microextraction for the analysis of some alcohols and esters in beer: comparison with static headspace method. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1462-1473.
- 306 Steffen, A. & Pawliszyn, J. (1996) Analysis of flavour volatiles using headspace solid-phase microextraction. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 2187-2193.
- 307 Salinas, M.R., Zalacain, A., Pardo, F. & Alonso, G.L. (2004) Stir bar sorptive extraction applied to volatile constituents evolution during *Vitis vinifera* ripening. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 4821-4827.
- 308 Marín, J., Zalacain, A., De Miguel, C., Alonso, G.L. & Salinas, M.R. (2005) Stir bar sorptive extraction for the determination of volatile compounds in oak-aged wines. *J. Chromatogr. A* **1098**, 1-6.
- 309 Díez, J., Domínguez, C., Guillén, D.A., Veas, R. & Barroso, C.G. (2004) Optimisation of stir bar sorptive extraction for the analysis of volatile phenols in wines. *J. Chromatogr. A* **1025**, 263-267.
- 310 Durán, E., Natera, R., Castro, R. & Barroso, C.G. (2006) Optimisation of stir bar sorptive extraction applied to the determination of volatile compounds in vinegars. *J. Chromatogr. A* **1104**, 47-53.
- 311 Ferreira, V., Hernández-Orte, P., Escudero, A., López, R. & Cacho, J. (1999) Semipreparative reversed-phase liquid chromatographic fractionation of aroma extracts from wine and other alcoholic beverages. *J. Chromatogr. A* **864**, 77-88.
- 312 Lablanquie, O., Snackers, G., Cantagrel, R. & Ferrari, G. (2002) Characterisation of young Cognac spirit aromatic quality. *Anal. Chim. Acta* **458**, 191-196.
- 313 Parker, I.G., Kelly, S.D., Sharman, M., Dennis, M.J. & Howie, D. (1998) Investigation into the use of carbon isotope ratios ($^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$) of Scotch whisky congeners to establish brand authenticity using gas chromatography-combustion-isotope ratio mass spectrometry. *Food Chem.* **63**, 423-428.
- 314 Mangas, J., Rodríguez, R., Moreno, J. & Blanco, D. (1996) Changes in the major volatile compounds of cider distillates during maturation. *Lebensm.-Wiss. u.-Technol.* **29**, 357-364.
- 315 Cortés, S., Gil, M.L. & Fernández, E. (2005) Volatile composition of traditional and industrial Orujo spirits. *Food Cont.* **16**, 383-388.
- 316 Apostolopoulou, A.A., Flouros, A.I., Demertzis, P.G. & Akrida-Demertzi, K. (2005) Differences in concentration of principal volatile constituents in traditional Greek distillates. *Food Cont.* **16**, 157-164.

-
- ³¹⁷ Soufleros, E.H., Mygdalia, A.S. & Natskoulis, P. (2004) Characterisation and safety evaluation of the traditional Greek fruit distillate "Mouro" by flavour compounds and mineral analysis. *Food Chem.* **86**, 625-636.
- ³¹⁸ Soufleros, E.H., Mygdalia, A.S. & Natskoulis, P. (2005) Production process and characterization of the traditional Greek fruit distillate "Koumaro" by aromatic and mineral composition. *J. Food Comp. Anal.* **18**, 699-716.
- ³¹⁹ Hernández-Gómez, L.F., Ubeda, J. & Briones, A. (2003) Melon fruit distillates: comparison of different distillation methods. *Food Chem.* **82**, 539-543.
- ³²⁰ Wang, M.L., Wang, J.T. & Choong, Y.M. (2004) A rapid and accurate method for determination of methanol in alcoholic beverage by direct injection capillary gas chromatography. *J. Food Comp. Anal.* **17**, 187-196.
- ³²¹ Villén, J., Señoráns, F.J., Reglero, G. & Herraiz, M. (1995) Analysis of wine aroma by direct injection in gas chromatography without previous extraction. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 717-722.
- ³²² Yang, M.-H. & Choong, Y.-M. (2001) A rapid gas chromatographic method for direct determination of short-chain (C₂-C₁₂) volatile organic acids in foods. *Food Chem.* **75**, 101-108.
- ³²³ MacNamara, K., Leardi, R. & Hoffmann, A. (1999) Direct injection of distilled spirits with PTV matrix removal: the perfect splitless injection?. *GIT Lab. J.* **3**, 10-12.
- ³²⁴ De Souza, M.D.C.A., Vásquez, P. Del Mastro, N.L., Acree, T.E. & Lavin, E.H. (2006) Characterization of cachaça and rum aroma. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 485-488.
- ³²⁵ Caldeira, I., Belchior, A.P., Clímaco, M.C. & Bruno de Sousa, R. (2002) Aroma profile of Portuguese brandies aged in chestnut and oak woods. *Anal. Chim. Acta* **458**, 55-62.
- ³²⁶ Lee, K.-Y.M., Paterson, A., Piggot, J.R. & Richardson, G.D. (2001) Sensory discrimination of blended Scotch whiskies of different product categories. *Food Quality and Preference* **12**, 109-117.
- ³²⁷ Peña y Lillo, M., Latrille, E., Casaubon, G., Agosin, E., Bordeu, E. & Martin, N. (2005) Comparison between odour and aroma profiles of Chilean Pisco spirit. *Food Quality and Preference* **16**, 59-70.
- ³²⁸ Aishima, T. (1991) Discrimination of liquor aromas by pattern recognition analysis of responses from a gas sensor array. *Anal. Chim. Acta* **243**, 293-300.
- ³²⁹ Martí, M.P., Pino, J., Boqué, R., Busto, O. & Guasch, J. (2005) Determination of ageing time of spirits in oak barrels using a headspace-mass spectrometry (HS-MS) electronic nose system and multivariate calibration. *Anal. Bioanal. Chem.* **382**, 440-443.
- ³³⁰ Cozzolino, D., Smyth, H.E., Cynkar, W., Damberg, R.G. & Gishen, M. (2005) Usefulness of chemometrics and mass spectrometry-based electronic nose to classify Australian white wines by their varietal origin. *Talanta* **68**, 382-387.
- ³³¹ Martí, M.P., Busto, O. & Guasch, J. (2004) Application of a headspace mass spectrometry system to the differentiation and classification of wines according to their origin, variety and ageing. *J. Chromatogr. A* **1057**, 211-217.
- ³³² Rodríguez, M.C., Guillén, D.A., Barroso, C.G. La nariz electrónica como herramienta para la diferenciación de tipos de Brandies de Jerez. *IX Congreso Nacional de Enólogos*. Bilbao, 2003.

- ³³³ Cantagrel, R., Vidal, J.P. Connaissance Analytique des spiritueux, possibilites de caracterisation de leur origine. *XX Congreso mundial de la viña y del vino. 72ª Asamblea general de la O.I.V.* Madrid, La Rioja, 1992.
- ³³⁴ Martí, M.P., Boqué, R., Busto, O. & Guasch, J. (2005) Electronic noses in the quality control of alcoholic beverages. *Trends Anal. Chem.* **24**, 57-66.
- ³³⁵ Rice-Evans C, Packer L. "Flavonoids in health and disease", Ed. Marcel Dekker, New York, 1998.
- ³³⁶ González-Paramás, A.M., Esteban-Ruano, S., Santos-Buelga, C., De Pascual-Teresa, S. & Rivas-Gonzalo, J.C. (2004) Flavanol content and antioxidant activity in winery byproducts. *J. Agric. Food Chem.* **52**, 234-238.
- ³³⁷ De Beer, D., Joubert, E., Gelderblom, W.C.A. & Manley, M. (2005) Antioxidant activity of south African red and white cultivar wines and selected phenolic compounds: in vitro inhibition of microsomal lipid peroxidation. *Food Chem.* **90**, 569-577.
- ³³⁸ Van Der Sluis, A.A., Dekker, M., Skrede, G. & Jongen, W.M.F. (2002) Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple juice. 1. Effect of existing production methods. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 7211-7219.
- ³³⁹ Oyaizu, M. (1986) Studies of products of browning reaction: antioxidative activity of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Jpn. J. Nutr.*, **44**, 307-315.
- ³⁴⁰ Lugasi, A. & Hóvári, J. (2003) Antioxidant properties of commercial alcoholic and nonalcoholic beverages. *Nahrung/Food.* **47**, 79-86.
- ³⁴¹ Benzie, I.F.F. & Strain, J.J. (1996) The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal. Biochem.* **239**, 70-76.
- ³⁴² Arnous, A., Makris, D.P. & Kefalas, P. (2001) Effect of principal polyphenolic components in relation to antioxidant characteristics of aged red wines. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5736-5742.
- ³⁴³ Gil, M.I., Tomás-Barberán, F.A., Hess-Pierce, B., Holcroft, D.M. & Kader, A.A. (2000) Antioxidant activity of pomegranate juice and its relationship with phenolic composition and processing. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4581-4589.
- ³⁴⁴ Shimada, K., Fujikawa, K., Yahara, K. & Nakamura, T. (1992) Antioxidative properties of xanthan on the autoxidation of soybean oil in cyclodextrin emulsion. *J. Agric. Food Chem.* **40**, 945-948.
- ³⁴⁵ Da Porto, C., Calligaris, S., Celotti, E. & Nicoli, M.C. (2000) Antiradical properties of commercial cognacs assessed by the DPPH test. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 4241-4245.
- ³⁴⁶ Vacca, V., Piga, A., Del Caro, A., Fenu, P.A.M. & Agabbio, M. (2003) Changes in phenolic compounds, colour and antioxidant activity in industrial red myrtle liqueurs during storage. *Nahrung/Food.* **47**, 442-447.
- ³⁴⁷ Milardovic, S., Ivekovic, D. & Grabaric, B.S. (2006) A novel amperometric method for antioxidant activity determination using DPPH free radical. *Bioelectrochemistry* **68**, 175-180.
- ³⁴⁸ Ukeda, H., Adachi, Y. & Sawamura, M. (2002) Flow injection analysis of DPPH radical based on electron spin resonance. *Talanta* **58**, 1279-1283.
- ³⁴⁹ Miller, N.J., Rice-Evans, C.A., Davies, M.J., Gopinathan, V. and Milner, A. (1993) A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin. Sci* **84**, 407-412.

-
- ³⁵⁰ Karakaya S., El, S.N. & Taş, A.A. (2001) Antioxidant activity of some foods containing phenolic compounds. *International Journal of Food Sciences and Nutrition* **52**, 501-508.
- ³⁵¹ Goldberg, D.M., Hoffman, B., Yang, J. & Soleas, G.J. (1999) Phenolic constituents, furans, and total antioxidant status of distilled spirits. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3978-3985.
- ³⁵² Alonso, A.M., Guillén, D.A. & Barroso, C.G. (2003) Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products. *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 445-448.
- ³⁵³ Alonso, A.M., Domínguez C., Guillén, D.A. & Barroso, C.G. (2002) Determination of antioxidant power of red and white wines by a new electrochemical method and its correlation with polyphenolic content. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 3112-3115.
- ³⁵⁴ Alonso, A.M., Castro, R., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A. & Barroso, C.G. (2004) Study of the antioxidant power of brandies and vinegars derived from Sherry wines and correlation with their content in polyphenols. *Food Res. Int.* **37**, 715-721.
- ³⁵⁵ Alonso, A.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G., Puertas, B. & García, A. (2002) Determination of antioxidant activity of wine byproducts and its correlation with polyphenolic content. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 5832-5836.
- ³⁵⁶ Araki, S., Kimiura, T., Shimizu, C., Furusho, S., Takashio, M. & Shinotsuka, K. (1999) Estimation of antioxidative activity and its relationship to beer flavour stability. *Am. Soc. Brew. Chem.* **57**, 34-37.
- ³⁵⁷ Fogliano, V., Verde, V., Randazzo, G. & Ritieni, A. (1999) Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 1035-1040.
- ³⁵⁸ Pellegrini, N., Del Río, D., Colombi, B., Bianchi, M. & Brighenti, F. (2003) Application of the 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) radical cation assay to a flow injection system for the evaluation of antioxidant activity of some pure compounds and beverages. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 260-264.
- ³⁵⁹ Arnao, M.B., Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F. & Acosta, M. (1996) Inhibition by L-ascorbic acid and other antioxidants of the 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) oxidation catalyzed by peroxidase: a new approach for determining total antioxidant status of foods. *Anal. Biochem.* **236**, 255-261.
- ³⁶⁰ Cano, A., Hernández-Ruiz, J., García-Cánovas, F., Acosta, M. & Arnao, M.B. (1998) An end-point method for estimation of the total antioxidant activity in plant material. *Phytochem. Anal.* **9**, 196-202.
- ³⁶¹ Parejo, I., Codina, C., Petrakis, C. & Kefalas, P. (2000) Evaluation of scavenging activity assessed by Co(II)/EDTA-induced luminol chemiluminescence and DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) free radical assay. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **44**, 3871-3880.
- ³⁶² Burns, J., Gardner, P.T., Matthews, D., Duthie, G.G., Lean, M.E.J. & Grozier, A. (2001) Extraction of phenolics and changes in antioxidant activity of red wines during vinification. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 5797-5808.
- ³⁶³ Whitehead, T.P., Thorpe, G.H.G. & Maxwell, S.R.J. (1992) Enhanced chemiluminescent assay for antioxidant capacity in biological fluids. *Anal. Chim. Acta* **266**, 265-277.
- ³⁶⁴ Maxwell, S., Cruickshank, A. & Thorpe, C. (1994) red wine and antioxidant activity in serum. *Lancet* **344**, 193-194.

-
- ³⁶⁵ Cao, G., Verdon, C.P., Wu, A.H.B., Wang, H. & Prior, R.L. (1995) Automated oxygen radical absorbance capacity assay using the COBAS FARA II. *Clin. Chem.* **41**, 1738-1744.
- ³⁶⁶ Talcott, S.T., Brenes, C.H., Pires, D.M. & Del Pozo-Insfran, D. (2003) Phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 957-963.
- ³⁶⁷ Killmartin, P.A., Zou, H. & Waterhouse, A.L. (2001) A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1957-1965.
- ³⁶⁸ Mannino, S., Brenna, O., Buratti, S. & Cosio, M.E. (1998) *Electroanalysis* **10**, 908-912.
- ³⁶⁹ Brenna, O. & Pagliarini, E. (2001) Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4841-4844.
- ³⁷⁰ Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. & Teissedre, P.L. (1995) Principal phenolic phytochemicals in selected California wines and their antioxidant activity in inhibiting oxidation of human low-density lipoproteins. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 890-894.
- ³⁷¹ Umar, A., Guerin, V., Renard, M., Boisseau, M., Garreau, C., Bégaud, B., Molimard, M. & Moore, N. (2003) Effects of armagnacs on human platelet function in vitro and on rat arteriovenous shunt thrombosis in vivo. *Thrombosis Research* **110**, 135-140.
- ³⁷² Umar, A., Depont, F., Jacquet, A., Lignot, S., Segur, M.C., Boisseau, M., Bégaud, B. & Moore, N. (2005) Effects of armagnac or vodka on platelet aggregation in healthy volunteers: a randomized controlled clinical trial. *Thrombosis Research* **115**, 31-37.
- ³⁷³ Martínez, R. (1999) "El análisis multivariante en la investigación científica" Editorial La Muralla S. A., Madrid, España.
- ³⁷⁴ Etxeberría, J. (1999) "Regresión múltiple" Editorial La Muralla S. A., Madrid, España.

CAPÍTULO II: MATERIALES Y MÉTODOS

1. DISOLUCIONES DE PATRONES Y REACTIVOS GENERALES

Las disoluciones de sustancias patrones fueron preparadas por pesada en balanza (Mettler AE240) de 10^{-5} g de sensibilidad y posterior disolución en matriz etanol:agua (40%:60%), que se consideró la más parecida a las muestras reales de brandy. Para la preparación de esta matriz, se utilizó agua ultrapura de calidad milli Q (Millipore, Waters), que también se utilizó para preparar la fase móvil en algunos de los equipos cromatográficos, y etanol absoluto (Panreac, para análisis). Las disoluciones de patrones se conservaron en el congelador. El gas Helio, empleado en algunas de las separaciones cromatográficas y suministrado por la instalación centralizada de gases de la Facultad de Ciencias, fue de Air Liquid (calidad 5.0).

2. ANÁLISIS DE AZUCARES

2.1. REACTIVOS Y SUSTANCIAS PATRONES

Los reactivos empleados durante el desarrollo experimental de este trabajo se presentan en la *tabla 1*, con indicación de la empresa suministradora y la pureza de los mismos.

REACTIVO	EMPRESA SUMINISTRADORA (calidad)
D-Galactosa	EXTRASYNTHES (For research use only)
D-(+)-Xilosa	EXTRASYNTHES (For research use only)
D-(-)-Arabinosa	EXTRASYNTHES (For research use only)
D-(+)-Glucosa	PANREAC (Para análisis)
D-(-)-Fructosa	PANREAC (Para análisis)
Sacarosa	PANREAC (Para análisis)
D-(+)-Manosa	EXTRASYNTHES (For research use only)
Maltosa (monohidrato)	SIGMA (Mínimo 99 %, SigmaUltra)
D-(+)-Fucosa	SIGMA (Apr. 98 %)
L-Ramnosa (monohidrato)	SIGMA (Mínimo 99%)
D-Ribosa	EXTRASYNTHES (For research use only)
Glicerina	SIGMA (99 %)
D-Sorbitol	SIGMA-ALDRICH (Mínimo 98 %)
Acetonitrilo	SCHARLAU (Supragradient HPLC grade)
Hidróxido sódico (lentejas)	PANREAC (purísimo, 97 %)
Hidrógenoftalato de potasio	ALDRICH (ReagentPlus 99,99 + %)
Fenolftaleína	PANREAC (Para análisis)

Tabla 1: Reactivos empleados en la fase experimental.

2.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La preparación de muestra se limitó a filtración mediante filtros de membrana de 0,45 µm.

2.3. ANÁLISIS DE AZÚCARES MEDIANTE HPLC-RI

2.3.1. Instrumentación



Figura 1: Equipo empleado para el análisis de azúcares mediante HPLC-RI.

El equipo instrumental utilizado para la separación y detección de azúcares mediante HPLC-RI (*figura 1*) estuvo formado por los siguientes componentes:

- Columna analítica: *High Performance Carbohydrate* (46 x 250 mm, Waters, Milford, MA) con relleno de gel de sílice ligada a grupos amino (cromatografía de adsorción en fase normal)^{1,2,3,4,5}.
- Bomba: *BROMMA 2150 HPLC PUMP* (LKB Pharmacia, Uppsala, Sweden).
- Inyector: *717 AUTOSAMPLER* (Waters, Milford, MA).
- Horno: *BROMMA 2155 HPLC COLUMN OVEN* (LKB Pharmacia, Uppsala, Sweden).
- Detector: *410 Differential Refractometer* (Waters, Milford, MA).
- Adquisición de datos: software *Millennium* versión 2.10.

2.3.2. Preparación de los eluyentes

El eluyente consistió en una mezcla acetonitrilo:agua que, una vez preparada, fue filtrada a vacío con filtro de nylon FH* (0,45 µm, Osmonics). Finalmente, el eluyente fue desgasificado durante 10-15 minutos en baño de ultrasonidos. La desgasificación es importante en la preparación del disolvente, ya que proporciona una línea base estable, tiempos de retención reproducibles y un buen funcionamiento de la bomba.

2.3.3. Condiciones de separación y detección

Durante el análisis, el helio es burbujeado constantemente en el reservorio de la fase móvil para proporcionar una línea base estable, una mejor sensibilidad y para evitar la reabsorción de gases atmosféricos. Para estabilizar la temperatura del detector antes de su uso, se debe fijar la temperatura y mantener el flujo de fase móvil durante 24 horas, previamente a la inyección. Las condiciones de separación y detección, que fueron optimizadas en el apartado de *resultados y discusión (1. Optimización del método HPLC-RI para el análisis de azúcares)*, se detallan en la *tabla 2*.

Fase móvil	ACN:H ₂ O (85%:15%)
Temperatura columna	45 °C
Temperatura detector	45 °C
Velocidad de flujo	0,7 mL/min
Constante de tiempo	1
Sensibilidad	64

Tabla 2: Condiciones utilizadas para la separación y detección de azúcares (HPLC-RI).

* Usado para compuestos poco polares, ya que el acetonitrilo es menos polar que el agua o el metanol.

2.4. ANÁLISIS DE AZÚCARES MEDIANTE HPAEC-PAD

2.4.1. Instrumentación

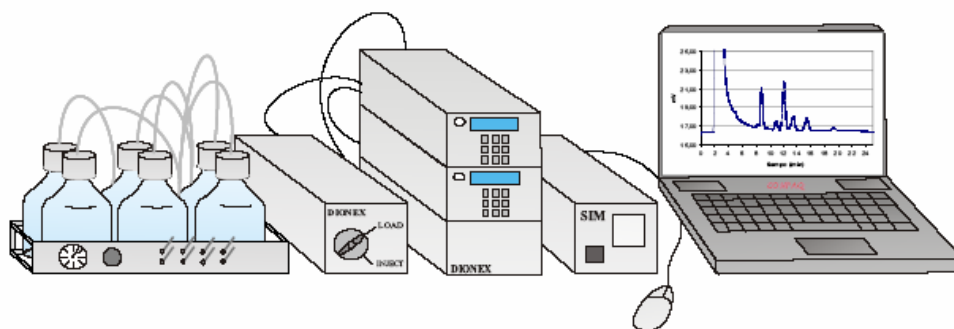


Figura 2: Equipo empleado para el análisis de azúcares mediante HPAEC-PAD.

La determinación de azúcares se realizó en un cromatógrafo iónico *Dionex DX-500* (Sunnyvale, California, E.E.U.U.) (figura 2). El equipo consta de una bomba gradiente cuaternaria (*GP40*), un módulo de desgaseificación de eluyentes y un detector electroquímico (*ED40*) que contiene una celda de detección con un electrodo de trabajo de oro y un electrodo de referencia de pH-Ag/AgCl. La bomba tiene una configuración de diámetro estándar con tuberías y émbolos de poliéter-éter-cetona (*PEEK*). Los datos fueron adquiridos mediante un software Millennium versión 2.10, conectado al equipo instrumental mediante un módulo de interfase de sistema (*SIM*), suministrado por Waters (Milford, MA).

Se ha empleado la columna *CarboPac PA1* (Dionex, 250 x 4 mm) como la más adecuada para el análisis de monosacáridos, así como una precolumna (*CarboPac PA1 guard*, Dionex), como paso previo a la columna analítica, con el objetivo de prolongar la vida de dicha columna.

2.4.2. Preparación de los eluyentes

Los eluyentes utilizados para el análisis de carbohidratos fueron disoluciones acuosas de hidróxido sódico. Es extremadamente importante minimizar la contaminación con carbonato del eluyente. El carbonato, anión divalente a $\text{pH} \geq 12$, se enlaza fuertemente a la columna e interfiere en los enlaces entre ésta y los carbohidratos, lo que produce una disminución drástica de la selectividad de la columna, así como una pérdida de resolución y eficacia.

El hidróxido sódico está disponible comercialmente en forma de *lentejas* que, debido a la acción del dióxido de carbono atmosférico, se encuentran recubiertas por una fina capa de carbonato sódico y, por tanto, no pueden ser utilizadas en este análisis. Para la preparación de los eluyentes se debe utilizar una disolución de hidróxido sódico al 50% en peso. A esa concentración (aproximadamente 19 M) los carbonatos son insolubles y precipitan en el fondo del recipiente. Esta disolución, una vez factorizada (utilizando como indicador una disolución de fenolftaleína al 2% en etanol) mediante valoración con ftalato ácido de potasio (debe ser secado durante 12 horas en horno y después mantenido en desecador), podrá emplearse para preparar los eluyentes, adicionando la cantidad necesaria sobre agua *milli-Q* desgasificada con helio (para minimizar la cantidad de dióxido de carbono disuelto).

Las disoluciones de hidróxido sódico se deben almacenar en recipientes de plástico. Asimismo, se deben utilizar pipetas de plástico para la preparación de los eluyentes, ya que el hidróxido sódico ataca a los boratos y silicatos del vidrio. El borato, a su vez, puede complejar a los carbohidratos y, por tanto, alterar su comportamiento cromatográfico. Una vez que los eluyentes han sido preparados, deben mantenerse bajo atmósfera de helio para evitar la disolución de dióxido de carbono atmosférico.

2.4.3. Condiciones de separación y detección

Las condiciones empleadas para la separación y detección de azúcares, así como para la regeneración de la columna después de cada análisis, se detallan en las *tablas 3* y *4*^{6,7}.

Eluyente A	50 mM NaOH
Eluyente B	100 % agua
Eluyente C	300 mM NaOH
Gradiente: % A + % B + % C (tiempo)	30% A + 70% B (0-25 min), 100% C (30-35 min), 30% A + 70% B (40-50 min)
Flujo de eluyente	1 mL/min
Inyector de <i>loop</i> fijo	25 µL
Detección	PAD
Modo de detección	Amperometría integrada
Características del pulso de la detección (tiempo)	0,05 V (0,00 s), 0,05 V (0,20 s), 0,05 V (0,40 s), 0,75 V (0,41 s), 0,75 V (0,60 s), -0,15 V (0,61 s), -0,15 V (1,00 s)
Tiempo de adquisición de datos	25 minutos

Tabla 3: Condiciones utilizadas para la separación y detección de azúcares (método A).

Eluyente A	50 mM NaOH
Eluyente B	100 % agua
Eluyente C	300 mM NaOH
Gradiente: % A + % B + % C (tiempo)	5% A + 95% B (0-40 min), 100% C (45-50 min), 5% A + 95% B (55-65 min)
Flujo de eluyente	1 mL/min
Inyector de <i>loop</i> fijo	25 µL
Detección	PAD
Modo de detección	Amperometría integrada
Características del pulso de la detección (tiempo)	0,05 V (0,00 s), 0,05 V (0,20 s), 0,05 V (0,40 s), 0,75 V (0,41 s), 0,75 V (0,60 s), -0,15 V (0,61 s), -0,15 V (1,00 s)
Tiempo de adquisición de datos	40 minutos

Tabla 4: Condiciones utilizadas para la separación y detección de azúcares (método B).

Los reservorios de los eluyentes se mantienen presurizados con He durante el análisis. La columna debe ser regenerada después de cada análisis, de lo contrario, el carbonato comenzará a contaminarla, independientemente del cuidado que se haya tenido en eliminarlo de los eluyentes. La regeneración de la columna se realizó mediante lavado con disolución de hidróxido sódico 300 mM (100% C) a un flujo de 1 mL/min. Este procedimiento también elimina otros contaminantes fuertemente enlazados a la columna, como péptidos y aminoácidos. Después del lavado, la columna fue re-equilibrada con una disolución de hidróxido sódico 16 mM a un flujo de 1 mL/min (en las mismas condiciones que las empleadas para la separación). El tiempo total empleado para el análisis de cada muestra, teniendo en cuenta los procesos de regeneración, re-equilibrado de la columna, y cambios en la composición de la fase móvil, es de 50 y 65 minutos para los métodos A y B, respectivamente. Aunque la muestra se introduce manualmente en el *loop* de muestra con una jeringa, la inyección es automática.

3. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES MEDIANTE GC-MS

3.1. REACTIVOS Y SUSTANCIAS PATRONES

Los reactivos empleados durante el desarrollo experimental de este trabajo se presentan en la *tabla 5*, con indicación de la empresa suministradora y la pureza de los mismos.

REACTIVO	EMPRESA SUMINISTRADORA (calidad)
Acetaldehído	MERCK (> 98 %)
Dietilacetal de acetaldehído (acetal)	MERCK (\geq 98 %)
Acetato de etilo	MERCK (para cromatografía)
Metanol	MERCK (para cromatografía)
2-Butanol	ALDRICH (99 %)
Butanoato de etilo	MERCK (> 98 %)
1-Propanol	MERCK (para cromatografía)
Isobutanol (2-metil-1-propanol)	MERCK (purísimo)
1-Butanol	MERCK (para cromatografía)
Alcohol isoamílico*	MERCK (\geq 98 %)
Hexanoato de etilo	MERCK (> 98 %)
Heptanoato de etilo	ALDRICH (99 %)
Octanoato de etilo	MERCK (> 98 %)
Nonanoato de etilo	ALDRICH (97 %)
Decanoato de etilo	MERCK (> 99 %)
Undecanoato de etilo	ALDRICH (97 %)
Dodecanoato de etilo	MERCK (> 99 %)
Tetradecanoato de etilo	FLUKA (> 99 %)
1-Hexanol	MERCK (> 98 %)
Cis-3-hexen-1-ol	MERCK (> 98 %)

Tabla 5: Reactivos empleados para el análisis de compuestos volátiles mediante CG-MS.

* Se denomina “alcohol isoamílico” a la suma de los isómeros 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol, que frecuentemente (y en particular en este trabajo) solapan en cromatografía de gases.

REACTIVO	EMPRESA SUMINISTRADORA (calidad)
Ácido acético	MERCK (100 %)
Decanoato de metilo	SIGMA (aprox. 99 %)
Succinato de dietilo	MERCK (> 99 %)
2-Feniletanol	MERCK (> 99 %)
Ácido butanoico	MERCK (> 99 %)
Ácido pentanoico	MERCK (> 99 %)
Ácido hexanoico	MERCK (98 %)
Ácido octanoico	MERCK (> 99 %)
Ácido decanoico	SIGMA (> 98 %)
4-Etilfenol	MERCK (> 98 %)
Glicerina	MERCK (99 %)
Ftalato de dietilo	FLUKA (> 96 %)
Eugenol	FLUKA (> 99 %)
Tartrato de dietilo	MERCK (> 99 %)
2-Furaldehído (furfural)	SIGMA (puro)
5-hidroximetilfurfural	ALDRICH (99 %)

Tabla 5 (continuación): Reactivos empleados para el análisis de compuestos volátiles mediante CG-MS.

3.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La preparación de muestra se limitó a filtración (filtros de membrana de 0,45 µm) y adición del patrón interno (decanoato de metilo).

3.3. ANÁLISIS CROMATOGRÁFICO

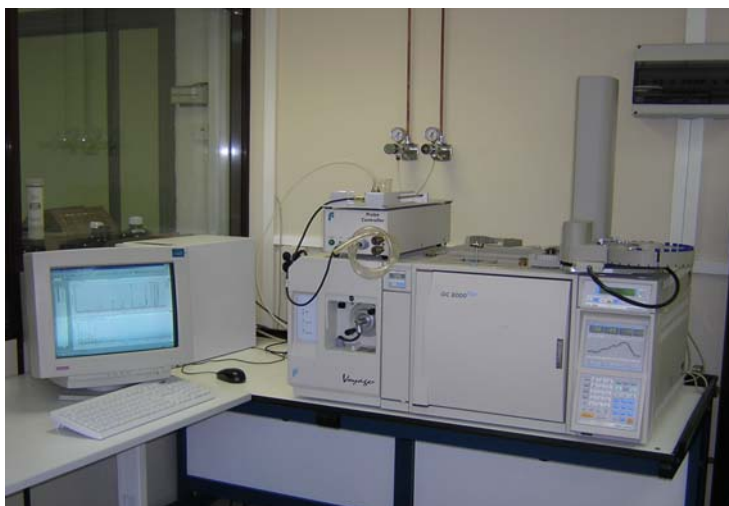


Figura 3: Equipo empleado para el análisis de compuestos volátiles mediante CG-MS.

Las muestras fueron analizadas en un equipo *ThermoQuest* modelo *Voyager* (figura 3) equipado con un cromatógrafo de gases *ThermoQuest* (Milán, Italia) y un detector de espectrometría de masas *Finnigan* (Manchester, Reino Unido).

El volumen de muestra inyectado fue de 1 μL y se realizó en el modo *splitless* durante 2 minutos. La temperatura del inyector fue de 250 $^{\circ}\text{C}$. El cromatógrafo de gases estaba equipado con una columna capilar *DB-Wax* (J&W Scientific, Folsom, CA, USA) de 60 metros de longitud, 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 μm de recubrimiento. Se utilizó He como gas portador, con una velocidad de flujo de 1 mL/min. El programa de temperatura del horno del cromatógrafo fue el siguiente: 35 $^{\circ}\text{C}$ durante 10 minutos, rampa de 5 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 100 $^{\circ}\text{C}$ y una nueva rampa de 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ hasta 210 $^{\circ}\text{C}$, donde permanece 40 minutos⁸. El tiempo total del análisis fue de 100 minutos.

Los compuestos fueron identificados y cuantificados mediante espectrometría de masas. Para ello se utilizó un espectrómetro de masas de cuadrupolo con detector

fotomultiplicador *Dynolite*. El detector de masas operó en el modo de impacto electrónico (corriente total de iones: TIC) con ionización positiva (EI^+) a 70 eV en un rango de 30-320 uma.

La señal se recogió y procesó con el programa *Xcalibur 1.2* (Finningan Corp. 1998-2000) que incluía la librería de espectros de masas *NIST 98 MS*. Las identificaciones de los picos cromatográficos se realizaron por similitud con los espectros de masas de la librería y fueron confirmadas con los tiempos de retención de los patrones en el caso de que éstos estuvieran disponibles. La cuantificación de los compuestos identificados se obtuvo mediante la medida de las áreas relativas de cada uno de ellos en relación a la del decanoato de metilo, que se utilizó como patrón interno.

4. OBTENCIÓN DE LOS ESPECTROS INFRARROJOS

4.1. INSTRUMENTACIÓN



Figura 4: Equipo empleado para la obtención de los espectros infrarrojos mediante FTIR.

Los espectros infrarrojos fueron registrados en un rango de $0\text{--}7895,53\text{ cm}^{-1}$ sin tratamiento previo de las muestras, con un espectrómetro *Multispec CETIM* (Francia) y software *Bacchus* de adquisición de datos. El equipo cuenta con termostatización ($25\text{ }^{\circ}\text{C}$) y filtración automatizadas. La resolución espectral fue de 4 cm^{-1} (valor usual para líquidos en los equipos disponibles en el mercado). El espectrómetro está equipado con un detector piroeléctrico (DTGS) y una fuente constituida por un elemento cerámico *Everglo* de 15 W . La celda de flujo posee ventanas de CaF_2 y espaciador de níquel de $20\text{ }\mu\text{m}$ (aproximadamente). Las conducciones del circuito de muestra fueron de silicona, teflón y un capilar de acero inoxidable.

5. MEDIDA DEL PODER ANTIOXIDANTE

5.1. REACTIVOS Y SUSTANCIAS PATRONES

Los reactivos empleados durante el desarrollo experimental de este trabajo se presentan en la *tabla 6*, con indicación de la empresa suministradora y la pureza de los mismos.

REACTIVO	EMPRESA SUMINISTRADORA (calidad)
Ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS)	SIGMA-ALDRICH (apr. 98 %)
Acido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico (Trolox)	SIGMA-ALDRICH (97 %)
Ácido nítrico 60% (HNO ₃)	PANREAC (60 %)
Acetato de zinc (Zn(CH ₃ COO) ₂)	PANREAC (purísimo)
Dihidrogenofosfato de potasio (KH ₂ PO ₄)	PANREAC (Para análisis)
Monohidrogenofosfato de sodio (Na ₂ HPO ₄)	FLUKA (Para análisis)
Hidróxido sódico (lentejas)	PANREAC (Purísimo, 97 %)
Ácido clorhídrico (HCl)	PANREAC (Ppurísimo)

Tabla 6: Reactivos empleados para la medida del poder antioxidante.

5.2. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

La disolución de ABTS 50 µM se prepara a pH = 6. Para ello, se utiliza como matriz un tampón fosfato de pH = 6, que se prepara mezclando 74,2 mL de KH₂PO₄ 0,5M y 8,58 mL de Na₂HPO₄ 0,5M, y diluyendo hasta 1 L. El pH se ajusta utilizando disoluciones de hidróxido sódico (1 M) y ácido clorhídrico (1M).

5.3. INSTRUMENTACIÓN

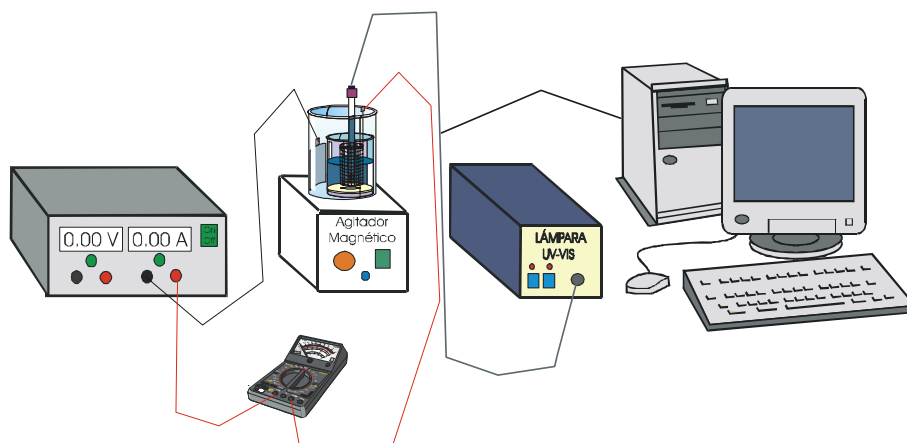


Figura 5: Dispositivo empleado para la medida del poder antioxidante⁹.

El dispositivo para la medida del poder antioxidante se basa en la generación del catión-radical cromóforo de larga vida $\text{ABTS}^{+\cdot}$ por oxidación en el ánodo del ABTS y en la habilidad de los antioxidantes presentes en la muestra estudiada para retrasar su aparición. Este método ha sido optimizado y validado previamente en el grupo de investigación¹⁰ a partir del dispositivo del “TEPA” (“Test Electroquímico de Pardeamiento Acelerado”, desarrollado¹¹ y patentado¹² por el grupo de investigación).

El dispositivo (figura 5) consiste en: un vaso de precipitados de 80 mL (cátodo) dentro del cual se sitúa un vaso filtrante de 30 mL, con tamaño de poro nº 4 (ánodo). Un electrodo de platino plano (30x60 mm) se sitúa en el cátodo y un electrodo de platino con forma de malla cilíndrica ($h = 22$ mm, $d = 22$ mm) se sitúa en el ánodo. Dentro del vaso filtrante hay un imán, en continua agitación durante el experimento por un agitador magnético (detalle del vaso de precipitados en figura 6).

La fuente de alimentación utilizada (FAC-307C de Promax) permite fijar las condiciones de trabajo y regular la intensidad constante. Para el seguimiento espectrofotométrico de la reacción se utiliza un espectrofotómetro miniaturizado (PC2000 de Ocean Optics) acoplado a una sonda de transmisión UV-Vis, con una fuente de luz halógena-deuterio (DH-2000 de Top Sensor Systems) y la intensidad de

corriente se mide con un multímetro (Hewlett-Packard). El espectrofotómetro miniaturizado se maneja mediante el programa *OOIBase32*.

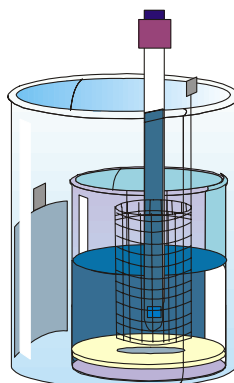


Figura 6: Detalle del vaso de precipitados del dispositivo de medida del poder antioxidante⁹.

El protocolo desarrollado para la medida del poder antioxidante de una muestra se detalla a continuación:

1. Se lavan los electrodos de platino durante 10 minutos con ácido nítrico 60%. Después, se enjuagan con agua destilada y se calcinan a la llama, durante medio minuto el cilíndrico y un minuto por cada cara el laminar.
2. Se colocan en el cátodo 30 mL de acetato de zinc saturado (40%) y en el ánodo 25 mL de la disolución de ABTS 50 μM a $\text{pH} = 6$, a la que se añaden alícuotas de las muestras en estudio. La disolución de ABTS está en continua agitación por el agitador magnético.
3. Antes de comenzar el ensayo, se registra el negro del espectrofotómetro con la sonda desconectada. Entonces se introduce la sonda en el recipiente del ánodo y se registra como blanco la disolución inicial antes de oxidar.

4. Se introducen los electrodos en los polos respectivos y se aplica una intensidad constante de 2 mA. Para comprobar que no hay variaciones, se registra cada 30 segundos con el multímetro.
5. El espectrofotómetro registra continuamente la absorbancia a 414 y 734 nm y el tiempo. El ensayo se da por terminado cuando se alcanza el máximo de absorbancia a 414 nm.
6. La función de respuesta utilizada son los culombios empleados en la oxidación de las muestras añadidas, calculados a partir del porcentaje de variación de la función (absorbancia 414 nm / absorbancia 734 nm) a lo largo del tiempo. Cuando esta variación se hace inferior al 10 %, se considera que ha comenzado la oxidación del ABTS y por tanto concluido la del antioxidante o muestra añadidos. El porcentaje de variación de la función (absorbancia 414 nm / absorbancia 734 nm) se mide mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta \left(\frac{A_{414}}{A_{734}} \right) \% = \left[\frac{\left(\frac{A_{414}}{A_{734}} \right)_i - \left(\frac{A_{414}}{A_{734}} \right)_{i-1}}{\left(\frac{A_{414}}{A_{734}} \right)_i} \right] \cdot 100$$

5.4. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La preparación de muestra se limitó a filtración (filtros de membrana de 0,45 µm). Los volúmenes de muestra que se utilizaron fueron optimizados con el objetivo de que el tiempo de oxidación no fuese demasiado corto, lo que aumentaría el error asociado a la medida, ni demasiado largo, que repercutiría en el tiempo de análisis. En la *tabla 7* se recogen los volúmenes utilizados para cada tipo de muestra. Los volúmenes menores, obviamente, corresponderán a los destilados con mayor poder antioxidante.

Grupo de muestras	Tipo	Volumen (mL)
Ensayo de envejecimiento	Solera	1
	Primera criadera	1,5
	Segunda criadera	1,5
	Tercera criadera	1,5
	Añadas	1
	Aguardientes*	1,5
Brandies de Jerez comerciales	Solera	2
	Solera Reserva	1
	Solera Gran Reserva	0,45
Destilados otros orígenes	Todos	1-1,5
Maceraciones y extractos	Todos	1,5
Colorante caramelo	Todos	1,5

Tabla 7: Volúmenes de muestra empleados para la medida del poder antioxidante.

6. MUESTREO

El estudio se ha llevado a cabo con muestras proporcionadas por el Consejo Regulador de la Denominación Específica Brandy de Jerez, procedentes tanto del marco de Jerez y de la solera piloto como de otras zonas (adquiridas en comercios).

6.1. SISTEMA PILOTO DE SOLERAS Y CRIADERAS

Esta solera piloto fue montada en el Laboratorio agroalimentario y Estación de Viticultura y Enología de Jerez**, con el objetivo de realizar un seguimiento analítico del aguardiente durante su etapa de envejecimiento. El sistema experimental está constituido por 15 botas de roble americano de 500 L*** de capacidad cada una (la llamada bota jerezana). Doce de estas botas se destinaron a envejecer aguardiente según el sistema dinámico de soleras y criaderas, mientras que las tres restantes alojaron el mismo aguardiente pero envejecido de manera estática, representando el

* Referido a los destilados que aún no han entrado en el sistema de envejecimiento, por tanto, no han estado en contacto con las botas.

** C/Córdoba nº 3, 11405 Jerez de la Frontera (Cádiz).

*** 30 arrobas. Una arroba equivale, según la costumbre, a 16,66 L.

sistema de añadas. Las botas del sistema dinámico se dispusieron en grupos de tres por cada escala: de mayor a menor vejez: solera -S- (botas 6, 11, 15), primera criadera -P- (botas 5, 10, 14), segunda criadera -G- (botas 2, 8, 13) y tercera criadera -T- (botas 1, 7, 12), tal como se muestra en la *figura 7*. El envejecimiento estático o por añadas -A- se desarrolló en las botas 3, 4 y 9 (*figura 7*). Todas las botas empleadas fueron envinadas (ver capítulo 1. *Elaboración del Brandy de Jerez*, de los *antecedentes*) con vino de Jerez Oloroso procedente de Bodegas Garvey. Las botas fueron desfondadas, rascadas y lavadas con agua a presión, conforme a los procedimientos tradicionales de la zona.



Figura 7: distribución espacial de las botas en el sistema experimental.

Todas las botas (sistema dinámico y añadas) contuvieron holandas de vino a una graduación de 40% (volumen). Los aguardientes de vino fueron suministrados por Sanivo S.A. y Pedro Domecq S.A., con una calidad de holandas de vino obtenidas a 65% vol. mediante columnas de destilación que trabajan en régimen continuo, empleando vapor como fuente de calor. En el sistema dinámico, los trasiegos programados cada tres meses suponían la extracción parcial (1/4 del volumen) del aguardiente contenido en cada bota, su mezcla y la división en tres volúmenes con los que rellenar a su vez los vacíos parciales originados en las botas de la escala de vejez inmediatamente superior. La tercera criadera se repone con aguardiente procedente de la destilería.

Para asegurar que las sacas se correspondían con la fracción prevista se diseñó un *bastón de saca*, que consiste en un tubo de acero inoxidable que ajusta a la boca de la bota. Por su interior discurre una cánula de 2,5 cm de diámetro que penetra 24 cm en el

interior de la vasija, lo que permite realizar una extracción del contenido de cada vasija hasta un máximo del 25 %. La bomba utilizada para los trasiegos, sacas y rocíos fue una *ITUR AM 100*, similar a las utilizadas de forma habitual en bodega.

Aprovechando las operaciones de saca y rocío del sistema dinámico, se realizaron muestreos de pequeños volúmenes cada tres meses (durante los cinco años que duró la experiencia de envejecimiento). Las muestras fueron extraídas de la mezcla obtenida tras la saca y mezcla del aguardiente procedente de las tres botas de cada escala en un depósito de acero inoxidable de 1000 L, considerándose por ello una media representativa de la escala en su conjunto. Así, la codificación incluye una primera letra que hace referencia a la escala de la que procede (T, G, P, S) o al sistema de añadas (A), y dos dígitos indicativos del nº de saca (de 00 a 19). Las botas destinadas al envejecimiento por el sistema de añadas no sufrieron más sacas que las necesarias para el muestreo, que se realizaron en las mismas fechas que las sacas del sistema dinámico. Las muestras del sistema de añadas se tomaron directamente de cada una de las tres vasijas mediante un dispositivo semejante al del sistema dinámico: un tubo de acero inoxidable con ajuste perfecto a la boca de la bota, a través del que discurre una cánula de 8 mm de diámetro que se introduce en la vasija hasta alcanzar una profundidad de 24 cm, equivalente a la profundidad del dispositivo de saca y rocío. La estrecha sección de la cánula permite la extracción de pequeños volúmenes (125 mL) a velocidad lenta, evitando que se rompan los gradientes de concentración. Finalmente, la mezcla de las tres alícuotas procedentes de las tres vasijas constituye la muestra.

La totalidad de las muestras (procedentes de los sistemas estático y dinámico), se conservaron en frascos topacio de 125 mL tras su extracción del sistema.

El tiempo medio que ha sido envejecido el brandy alojado en una bota del sistema dinámico de envejecimiento se mide mediante el *tiempo medio de envejecimiento*, que surge como consecuencia de los fenómenos de saca y rocío. Este parámetro fue introducido en 1982 por Casas, J.¹³ con el objetivo de determinar la edad media del Brandy contenido en una vasija del sistema dinámico, teniendo en cuenta las sacas y rocíos que se realizan periódicamente en el sistema. Por tanto, resulta más correcto, para el caso del brandy de Jerez que utiliza el sistema dinámico, hablar de tiempo medio de envejecimiento que de vejez (o tiempo de envejecimiento), parámetro que se reserva para el sistema de añadas, en el que el aguardiente permanece en la misma bota durante todo el envejecimiento. El tiempo medio de envejecimiento se calcula a partir de la siguiente ecuación, equivalente al tiempo de residencia en procesos continuos:

$$t_{medio} = \frac{\text{Volumen total de brandy}}{\text{Volumen de saca anual}}$$

Teniendo en cuenta que el volumen total de brandy es la suma de los volúmenes de cada una de las escalas y que todas ellas tienen el mismo volumen, la ecuación anterior se podría expresar de la siguiente forma:

$$t_{medio} = \frac{N.V}{S.F.V} = \frac{N}{F.S}$$

Donde:

- N = Número de escalas
- V = Volumen de una escala
- F = Fracción de saca de la escala
- S = Número de sacas/rocíos anuales.

Tal como se observa en la ecuación final, el tiempo medio de envejecimiento depende del número de escalas de sistema (N), de la fracción de saca (F) y del número de sacas anuales, (S) mientras que es independiente del volumen de las escalas. Para el cálculo de este parámetro se tuvieron en cuenta el número de sacas por año, el volumen total del sistema, el volumen de cada saca realizada y el número de escalas.

En el caso de la experiencia de envejecimiento del brandy, tenemos que $F = 0,25$ (en cada saca, se extrae $\frac{1}{4}$ del contenido de la bota) y $S = 4$, ya que se realizó una saca/rocío cada tres meses. Por tanto, podemos calcular los objetivos de envejecimiento medio para cada escala:

- Solera: $N = 4 \rightarrow t_{medio} = 4$ años.
- Primera Criadera: $N = 3 \rightarrow t_{medio} = 3$ años.
- Segunda Criadera: $N = 2 \rightarrow t_{medio} = 2$ años.
- Tercera Criadera: $N = 1 \rightarrow t_{medio} = 1$ año.

Los tiempos medios de envejecimiento calculados para las muestras procedentes del sistema piloto de Soleras y Criaderas se presentan en las *tablas 7 y 8*. Las muestras han sido clasificadas en los tres tipos comerciales (S: Solera, SR: Solera Reserva o SGR: Solera Gran Reserva) en función del tiempo medio de envejecimiento calculado. En algunos casos, los muestreos no se realizaron exactamente cada tres meses. Los valores que se presentan en la tabla han sido corregidos teniendo en cuenta las fechas reales de muestreo. Como se deduce de las *tablas 8 y 9*, las muestras S01, P01, G01, T01 y T02 poseen tiempos medios de envejecimiento demasiado bajos (menores de 6

meses) que impiden clasificarlas como Solera, por lo que no serán incluidas en los tratamientos estadísticos relativos a la clasificación de los brandies en función de la categoría comercial.

En la *figura 8* se muestra la representación gráfica de la vejez media (tiempo medio de envejecimiento) frente al número de Saca para las 4 escalas, donde se observa que cada una de las escalas tiende asintóticamente al valor del tiempo de envejecimiento medio calculado previamente para cada escala (objetivo de envejecimiento para cada escala).

SOLERA			ESCALA P		
Muestra	Vejez media	Tipo	Muestra	Vejez media	Tipo
S-01	0,25	-	P-01	0,25	-
S-02	0,51	S	P-02	0,51	S
S-03	0,76	S	P-03	0,76	S
S-04	0,99	S	P-04	0,99	S
S-05	1,26	SR	P-05	1,25	SR
S-06	1,58	SR	P-06	1,54	SR
S-07	1,77	SR	P-07	1,69	SR
S-08	1,97	SR	P-08	1,85	SR
S-09	2,26	SR	P-09	2,09	SR
S-10	2,46	SR	P-10	2,23	SR
S-11	2,70	SR	P-11	2,41	SR
S-12	2,82	SR	P-12	2,46	SR
S-13	3,00	SR	P-13	2,57	SR
S-14	3,20	SGR	P-14	2,71	SR
S-15	3,34	SGR	P-15	2,79	SR
S-16	3,43	SGR	P-16	2,82	SR
S-17	3,54	SGR	P-17	2,87	SR
S-18	3,67	SGR	P-18	2,96	SR
S-19	3,82	SGR	P-19	3,06	SGR

Tabla 8: Tiempo medio de envejecimiento de las muestras de ensayo de envejecimiento procedentes de la Solera y la primera escala.

ESCALA G			ESCALA T		
Muestra	Vejez media	Tipo	Muestra	Vejez media	Tipo
G-01	0,25	-	T-01	0,25	-
G-02	0,51	S	T-02	0,45	-
G-03	0,74	S	T-03	0,58	S
G-04	0,94	S	T-04	0,67	S
G-05	1,14	SR	T-05	0,77	S
G-06	1,37	SR	T-06	0,90	S
G-07	1,45	SR	T-07	0,87	S
G-08	1,52	SR	T-08	0,87	S
G-09	1,68	SR	T-09	0,97	S
G-10	1,75	SR	T-10	0,98	S
G-11	1,85	SR	T-11	1,03	SR
G-12	1,84	SR	T-12	0,96	S
G-13	1,88	SR	T-13	0,99	S
G-14	1,97	SR	T-14	1,05	SR
G-15	2,01	SR	T-15	1,05	SR
G-16	1,99	SR	T-16	1,02	SR
G-17	2,01	SR	T-17	1,02	SR
G-18	2,07	SR	T-18	1,07	SR
G-19	2,14	SR	T-19	1,13	SR

Tabla 9: Tiempo medio de envejecimiento de las muestras de ensayo de envejecimiento procedentes de la segunda y tercera escala.

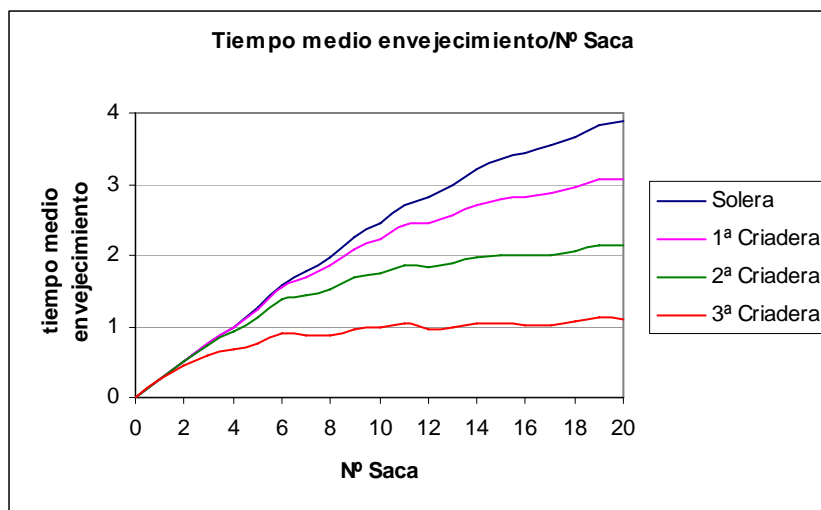


Figura 8: Tiempo medio de envejecimiento frente al número de saca.

6.2. BRANDIES DE JEREZ COMERCIALES

Se han analizado un total de 64 muestras comerciales de *Brandy de Jerez*, todas ellas suministradas por los Servicios de Inspección del Consejo Regulador de la Denominación Específica *Brandy de Jerez*, que las recibió ya embotelladas desde los almacenes de cada una de las empresas inscritas en el Registro de Bodegas de elaboración y envejecimiento del *Brandy de Jerez*.

Las muestras fueron tomadas por cuadruplicado, con levantamiento de acta, lacradas y selladas por los Servicios de Inspección, dejando un ejemplar de cada una de ellas en poder de la empresa como referencia. Las otras tres botellas de cada marca fueron desprecintadas en la Sede del Consejo Regulador y trasvasadas a recipientes de color topacio, codificándolas de forma que no se pudiesen reconocer cada una de las marcas comerciales a las que pertenecen. Una de ellas quedó depositada como referencia en la sede del Consejo Regulador de la Denominación Específica *Brandy de Jerez*.

Del total de muestras, 21 son del tipo *Brandy de Jerez Solera*, 18 de *Brandy de Jerez Solera Reserva* y 25 de *Brandy de Jerez Solera Gran Reserva*. Este muestreo

tiene una representatividad del 100 % de las bodegas inscritas en el Consejo Regulador, y una cobertura en producto comercializado de casi el 100 %.

6.3. DESTILADOS ENVEJECIDOS DE DISTINTO ORIGEN

En este estudio también se emplearon 35 brandies comerciales embotellados adquiridos en el mercado, de los que 12 son nacionales sin denominación (procedentes de Córdoba, Murcia, Málaga, Cataluña, etc.), 19 franceses (11 Cognacs, 4 Armagnacs y 4 sin denominación en su etiquetado) y 4 brandies sudafricanos. El procedimiento seguido para evitar el reconocimiento de las marcas comerciales es el mismo que el caso de los *Brandies de Jerez*.

6.4. COLORANTES CARAMELO

Los caramelos han sido cedidos por las empresas inscritas en el Consejo Regulador del *Brandy de Jerez* y representan más del 95 % de los empleados en brandies comerciales. Entre los fabricantes se encuentran SECNA, COSMOS, CERESTAR y alguno de elaboración artesanal a partir de mosto de uva.

6.5. MACERADOS E INFUSIONES AROMÁTICAS

Los extractos y macerados utilizados se seleccionaron de acuerdo a su mayor uso en las prácticas tradicionales de elaboración del *Brandy de Jerez*. De esta forma, se analizaron extractos de pericarpio de almendra, cáscara de nueces, uvas pasas, vainas de vainilla, ciruelas pasas, roble tostado y sin tostar. Todos estos extractos fueron facilitados por un elaborador de la zona.

6.6. VINOS DULCES

Se analizaron muestras de vinos dulces de la variedad *Pedro Ximénez* (adquiridas en comercios). Este tipo de vino dulce se considera como el más utilizado en la elaboración del Brandy de Jerez.

7. PROGRAMAS INFORMÁTICOS

Para el procesamiento y el tratamiento estadístico de los datos se emplearon los paquetes estadísticos que se enumeran a continuación:

- Para la calibración externa se ha utilizado el programa *ALAMIN*¹⁴ versión 1.0. (Departamento de Química Analítica, Universidad de Granada) y la hoja de cálculo Microsoft Excel 2002. El programa *QUIMIOMETRÍA PRÁCTICA*¹⁵ permitió la comparación entre las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas por calibración externa y adiciones estándar.
- El análisis lineal discriminante y el estudio previo de la estructura de los datos se realizaron mediante el programa *STATISTICA for Windows* (version 4.5, StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA).
- La reducción de dimensiones mediante análisis de componentes principales, la regresión de componentes principales, la regresión de mínimos cuadrados parciales, la regresión lineal múltiple y los distintos pretratamientos ensayados se llevaron a cabo con la ayuda del software *Unscrambler*¹⁶ (versión 7.5, CAMO ASA, Oslo, Norway). La reducción de dimensiones por transformada de Fourier se desarrolló con el programa Matlab (version 6.0.0.88 Release 12, The MathWorks, Inc.).
- Para el análisis clasificatorio y la predicción mediante redes neuronales artificiales se utilizó el programa *V-Parvus* (version 2.1, 2004, modulo *V-CLANN* para análisis clasificatorio y módulo *V-REGANN* para la regresión). El programa *V-Parvus* utiliza para el entrenamiento el algoritmo de retropropagación. Las redes neuronales que proporciona este programa constan de tres capas de neuronas (capa de entrada, capa oculta y capa de salida) y emplean funciones de activación sigmoidales (las más comúnmente descritas en la bibliografía).

8. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Wei, Y. & Ding, M.-Y. (2000) Analysis of carbohydrates in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *J. Chromatogr. A* **904**, 113-117.
- ² Mendes, E., Brojo, E., Ferreira, I. M. P. L. V. O. & Ferreira, M. A. (1998) Quality evaluation of Portuguese honey. *Carbohydrate Polymers* **37**, 219-223.
- ³ Vérette, E., Qian, F. & Mangani, F. (1995) On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages. *J. Chromatogr. A* **705**, 195-203.
- ⁴ Vendrell, S., Castellote, A. I. & López, M. C. (2000) Determination of inulin in meat products by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *J. Chromatogr. A* **881**, 591-597.
- ⁵ Rodríguez, M. D., Villanueva, M. J. & Redondo, A. (1999) Effects of processing conditions on soluble sugars content of carrot, beetroot and turnip. *Food Chem.* **66**, 81-85.
- ⁶ Kerhervé, P., Charrière, B. & Gadel, F. (1995) Determination of marine monosaccharides by high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **718**, 283-289.
- ⁷ Carrera, C. (2001) Estudio de los subproductos de la vinificación. Polisacáridos de las lías del vino de Jerez. *Trabajo de Investigación*. Universidad de Cádiz, 2001.
- ⁸ Castro, R., Natera, R., García, M.V. & Barroso, C.G. (2002) Optimisation of headspace solid-phase microextraction for analysis of aromatic compounds in vinegar. *J. Chromatogr. A* **953**, 7-15.
- ⁹ Alonso, A.M. Estudio del poder antioxidante en productos vitivinícolas. *Tesis Doctoral*. Universidad de Cádiz, 2003.
- ¹⁰ Alonso, A.M., Guillén, D.A., Barroso, C.G. (2003) Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products. *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 445-448.
- ¹¹ Palma, M., Barroso, C.G. & Pérez-Bustamante, J.A. (2000) Evaluation of similarities between natural and accelerated browning of fino sherry wines by chemometric techniques. *Analyst* **125**, 1151-1154.
- ¹² Barroso CG, Palma M. *Patente nacional* P9601884.
- ¹³ Casas, J. (1982) *Agricultura* 810-814.
- ¹⁴ García, A.M., Cuadros, L., Alés, F. & Román, M. (1997) ALAMIN: a chemometric program to check analytical method performance and to assess the trueness by standard addition methodology. *Trends Anal. Chem.* **16**, 381-385.
- ¹⁵ Cela, R., Blanco, M., Boqué, R., Cela, R., Coello, J., MasPOCH, S., Ortiz, M. C., Riba, J., Rius, F. X., Ruíz, A., Sarabia, L. A. & Tomás, X. (1994) *Servicio de publicaciones e intercambio científico*. Universidad Santiago de Compostela.
- ¹⁶ CAMO ASA (1998) "The Unscrambler User Manual".

CAPÍTULO III: **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

1. OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO HPLC-RI PARA EL ANÁLISIS DE AZÚCARES

En vista de la amplia bibliografía encontrada sobre la medida de azúcares en alimentos y bebidas utilizando un detector de índice de refracción (ver capítulo 4.1. *Análisis de azúcares*, de los *antecedentes*), se decidió ensayar esta metodología para la determinación de azúcares en *Brandy de Jerez* (a pesar de los elevados límites de detección mencionados en la bibliografía).

1.1. ANÁLISIS DE DISOLUCIONES DE PATRONES

Los patrones de azúcares que se utilizaron fueron seleccionados a partir de la bibliografía (ver capítulo 3. *Parámetros de calidad en destilados envejecidos en madera*, de los *antecedentes*). Los parámetros susceptibles de optimización que afectan al análisis, figuran en la *tabla 1*.

Separación	Detección
Composición de la fase móvil	Constante de tiempo
Velocidad de flujo	Temperatura del detector
Temperatura de la columna	Sensibilidad

Tabla 1: Parámetros estudiados en el análisis de azúcares.

Para una exploración inicial, se analizaron por separado patrones de distintos azúcares en las condiciones cromatográficas que se encontraron más frecuentemente en la bibliografía, sin que dieran resultados aceptables, por lo que se procedió a la optimización de la separación.

1.2. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA SEPARACIÓN

A continuación, se estudiaron los parámetros relacionados con la separación de los compuestos en la columna analítica, manteniendo constantes los parámetros relacionados con la detección. Los diferentes ensayos se realizaron sobre una mezcla de xilosa, glucosa, fructosa y sacarosa (eluidos en ese orden). Esta mezcla presentó señales anchas y un solapamiento parcial entre los picos cromatográficos de glucosa y

fructosa, que permitió evaluar el efecto de las distintas modificaciones del método sobre el mismo.

- **Separación.1: Composición de la fase móvil.**

El objetivo que se persigue al modificar la polaridad de la fase móvil es aumentar los tiempos de retención de los azúcares para conseguir una mejor resolución de los picos cromatográficos, sobre todo al principio del cromatograma, donde la señal del etanol interfiere considerablemente.

Siendo la fase estacionaria de trabajo una fase polar (fase amino), la fase móvil debería ser más apolar para que los azúcares, que son compuestos polares, sean más retenidos por la columna. Se plantearon ensayos con las siguientes fases móviles:

- ACN:H₂O (85%:15%)
- ACN:H₂O (95%:5%)
- ACN:Iso-propanol:H₂O (50%:25%:25%)
- 1,4-dioxano:H₂O (75%:25%)
- Iso-propanol:H₂O (75%:25%)

Todos los disolventes debían tener índices de refracción en el rango 1,00-1,75 (*tabla 2*), ya que el refractómetro utilizado trabaja con disolventes cuyos índices de refracción estén en ese intervalo¹. Se bajó progresivamente la polaridad de la fase móvil, bien disminuyendo la proporción de agua, o bien sustituyendo el acetonitrilo por disolventes de menor polaridad (*tabla 2*).

Disolvente	IR*	Polaridad**
Agua	1,333	10,2
Acetonitrilo	1,341	5,8
Iso-propanol	1,384	3,9
1,4-Dioxano	1,420	4,8
Etanol	1,359	4,3

Tabla 2: Principales características de los disolventes ensayados.

* Índice de refracción a 25 °C.

** Índice de Polaridad.

La composición de fase móvil utilizada como punto de partida fue ACN:H₂O 75%:25%, descrita en la bibliografía para la separación y detección de azúcares en columnas de similar relleno utilizando un detector de índice de refracción^{2,3}. Al pasar de ACN:H₂O 75%:25% a ACN:H₂O 85%:15%, los picos cromatográficos se retrasaron (de 5,82 minutos a 7,41 en el caso de la xilosa), fueron menos altos y más anchos. No obstante, el aumento en el tiempo de retención que supuso el uso de ACN:H₂O 85%:15% se consideró más valioso que el ensanchamiento de las señales. Cuando se utilizó ACN:H₂O 95%:5% para el análisis de la mezcla de glucosa, xilosa, fructosa y sacarosa, los tiempos de retención aumentaron, aunque esto no se tradujo en una mejor separación, pues sólo dos señales (asimétricas y con cola en la parte derecha) integraron el cromatograma (solapamientos).

Los demás disolventes ensayados (ACN:iso-propanol:H₂O, 1,4-dioxano:H₂O, iso-propanol:H₂O) no fueron aplicables en la práctica, ya que la presión en la columna aumentó mucho, por lo que se descartaron estas posibilidades. Este aumento de presión se debe a la elevada viscosidad del iso-propanol y 1,4-dioxano (1,90 y 1,20, respectivamente) comparadas con la del acetonitrilo (0,34). En conclusión, de entre las fases móviles ensayadas se seleccionó ACN:H₂O 85%:15% como la más adecuada para el análisis.

- **Separación.2: Velocidad de flujo.**

Se ensayó si un aumento de la velocidad de flujo podría mejorar la separación, proporcionando señales más estrechas. Se seleccionó una velocidad de flujo de 1,4 mL/min para el análisis de la mezcla de xilosa, glucosa, fructosa y sacarosa. El resultado fueron picos cromatográficos más altos y estrechos pero no mejor resueltos, manteniéndose el solapamiento entre fructosa y glucosa, característico de esta mezcla. También se observó un aumento de la presión en la columna, desde 33-35 bares con flujo 0,7 mL/min a 59-61 bares con flujo 1,4 mL/min. De esta forma, se decidió mantener la velocidad de flujo en 0,7 mL/min.

- **Separación.3: Temperatura de la columna analítica^{*}.**

Los efectos de utilizar elevadas temperaturas son, a priori, los siguientes:

- Reduce la viscosidad de la fase móvil.
- Aumenta la solubilidad de la muestra.
- Aumenta la velocidad de transferencia de masa, lo que mejora la eficiencia de la columna.
- Disminuye los tiempos de retención.
- Hace al sistema menos susceptible a fluctuaciones de la temperatura ambiente.
- Permite la eliminación de los gases disueltos en disolventes más fríos que no estén completamente desgasificados (origina burbujas).
- Disminuye la presión de trabajo.

Se ensayaron las siguientes temperaturas en el horno que contenía a la columna analítica:

- Sin control de temperatura.
- 25°C (T_{detector} : 35°C).
- 30°C (T_{detector} : 35°C).
- 35°C (T_{detector} : 40°C).
- 45°C (T_{detector} : 45°C).

En general, se observó una mejor separación entre las señales a medida que aumentaba la temperatura, por lo que se concluyó que la temperatura idónea sería de 45 °C para la columna analítica.

^{*} Esta variable se estudió de forma conjunta con la variable “temperatura del detector”, ya que la temperatura del detector debe ser aproximadamente 5 °C mayor que la de la columna analítica.

1.3. OPTIMIZACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE LA DETECCIÓN

- **Detector.1: Constante de tiempo.**

La constante de tiempo ajusta el tiempo de respuesta del filtro de ruido para conseguir una óptima relación señal/ruido (S/N) por reducción del ruido de tiempo corto.

Una disminución en la constante de tiempo debería provocar, a priori, los siguientes efectos:

- Producir picos cromatográficos más estrechos con una mínima distorsión de pico y retraso en el tiempo.
- Aumentar el ruido de la línea base.
- Reducir el tiempo empleado en el *auto-cero*.

Por el contrario, un aumento en la constante de tiempo debería:

- Disminuir el ruido de la línea base.
- Acortar y ensanchar las señales.
- Aumentar la cantidad de tiempo empleado en el *auto-cero*.

Teniendo en cuenta estas consideraciones, se ensayó una constante de tiempo de 0,2 (la más pequeña que proporciona el detector). Sin embargo, los resultados reflejaron que la anchura de pico no se vio afectada por la disminución en la constante de tiempo, por lo que se seleccionó como mejor opción la constante de tiempo igual a 1, que produce menos ruido en la línea base.

Fase móvil	ACN:H ₂ O (85%:15%)
Temperatura columna	45 °C
Temperatura detector	45 °C
Presión en columna	33-34 bares
Velocidad de flujo	0,7 mL/min
Constante de tiempo	0,2
Sensibilidad	8

Tabla 3: Condiciones de separación y detección cuando se disminuye la constante de tiempo.

- **Detector.2: Temperatura del detector.**

El refractómetro utilizado permite un rango de temperatura¹ de 30 a 50 °C. La temperatura general de operación para el detector debería ser alrededor de 5 °C por encima de la temperatura de la columna analítica¹. Esta precaución evita las fluctuaciones causadas por las variaciones de la temperatura. El efecto de la variación de la temperatura del detector sobre el cromatograma de la mezcla (glucosa, xilosa, fructosa, sacarosa) analizada fue evaluado de forma conjunta con la temperatura de la columna analítica, concluyéndose una temperatura óptima de 45 °C para la columna analítica y el detector (*Separación.3: Temperatura de la columna analítica*, en el capítulo 1. *Optimización del método HPLC-RI para el análisis de azúcares*).

- **Detector.3: Sensibilidad.**

La sensibilidad afecta tanto a la integración como a la recogida de la señal. Cuanto mayor es la sensibilidad, mayor es la respuesta para un determinado cambio del índice de refracción y mayor también es el ruido de la línea base. Una sensibilidad elevada produce un aumento en el área de los picos cromatográficos, en el ruido de la línea base y en la sensibilidad a fluctuaciones ambientales.

Los efectos de aumentar la sensibilidad del detector fueron evaluados para tres sensibilidades diferentes (8, 64 y 1024), que cubrían la escala de sensibilidades que ofrece el refractómetro. Finalmente, se eligió una sensibilidad de 64, que ofrecía un compromiso entre una elevada área de los picos cromatográficos y bajo ruido en la línea base.

1.4. CONDICIONES FINALES

El análisis de la mezcla de glucosa, xilosa, fructosa y sacarosa (mezcla usada para estudiar los diferentes parámetros del método) mediante las condiciones optimizadas como resultado de este estudio (*tabla 4*) proporcionó un cromatograma como el que aparece en la *figura 1*. Los azúcares fueron identificados a partir de los tiempos de retención de los patrones analizados individualmente.

Fase móvil	ACN:H ₂ O (85%:15%)
Temperatura columna	45 °C
Temperatura detector	45 °C
Velocidad de flujo	0,7 mL/min
Constante de tiempo	1
Sensibilidad	64

Tabla 4: Condiciones óptimas para el análisis de azúcares con detector de índice de refracción.

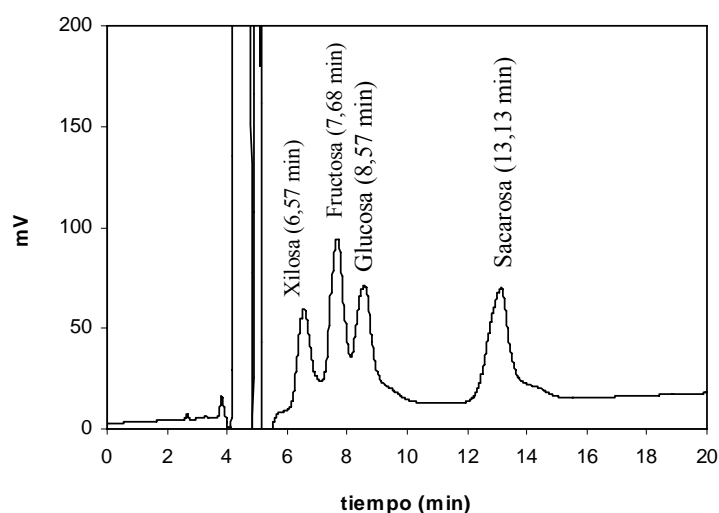


Figura 1: Cromatograma de la mezcla de patrones (glucosa, xilosa, fructosa y sacarosa) obtenido con las condiciones óptimas.

1.5. ANÁLISIS DE MUESTRAS DE BRANDY

Con las variables metodológicas optimizadas, se procedió al análisis de una muestra de brandy procedente del ensayo de envejecimiento y de una muestra de *Brandy de Jerez* comercial. En el cromatograma del brandy S05 procedente del sistema

de envejecimiento no se registró ninguna señal (*figura 2*). Sin embargo, en el cromatograma del brandy comercial, se distinguieron dos picos cromatográficos con un pequeño solapamiento entre sí (*figura 3*). Estos picos fueron identificados como fructosa y glucosa (eluidos en ese orden), por comparación de los tiempos de retención con la mezcla de patrones.

A partir de estos resultados, se concluyó la necesidad de un sistema más sensible y selectivo para la determinación de azúcares en los brandies del ensayo de envejecimiento. No obstante, el detector de índice de refracción, con separación mediante cromatografía de adsorción en fase normal (HPLC-RI), sí resulta válido para la determinación de azúcares mayoritarios (sobre todo glucosa y fructosa) en *Brandies de Jerez* comerciales.

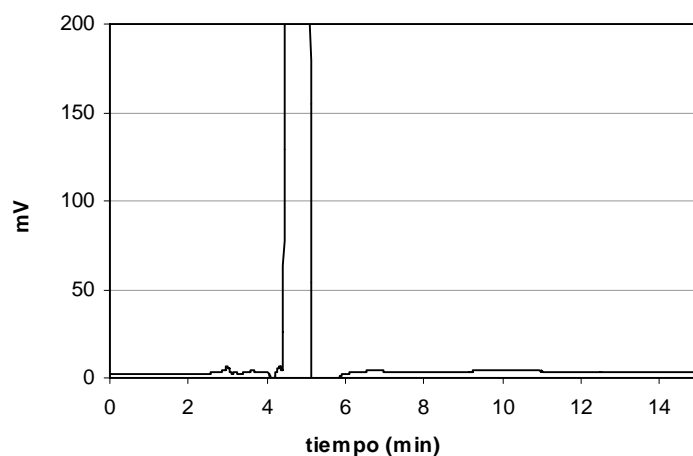


Figura 2: Brandy S05 de la experiencia de envejecimiento.

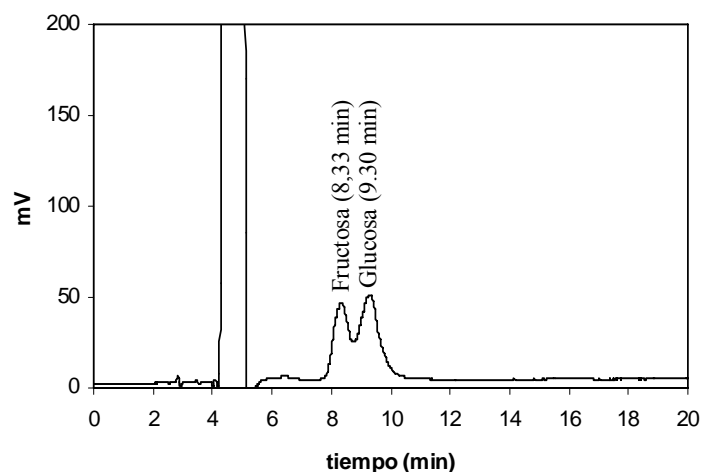


Figura 3: Brandy de Jerez comercial.

2. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES MINORITARIOS EN BRANDIES DEL SISTEMA PILOTO MEDIANTE HPAEC-PAD

2.1. IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN BRANDY

En vista de los resultados obtenidos con el detector de índice de refracción, se llegó a la conclusión de la necesidad de un método más sensible y selectivo para la determinación de azúcares en los brandies del ensayo de envejecimiento, como es el caso de la cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia (HPAEC), acoplada con la detección amperométrica de pulsos (PAD). Esta técnica permite la cuantificación directa de carbohidratos no derivatizados a niveles de picomoles con una mínima preparación de muestra.

Para la identificación de los azúcares, se utilizó una muestra de brandy del sistema de envejecimiento, sobre la que se realizaron sucesivas adiciones con las disoluciones de los patrones (azúcares) elegidos a partir de la bibliografía existente al respecto (ver capítulo 3. *Parámetros de calidad en destilados envejecidos en madera*, de los *antecedentes*). Las adiciones, utilizando el método A de separación y detección,

permitieron identificar los compuestos presentes en el brandy como (por orden de elución): arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa + manosa, y fructosa (*figuras 4 y 5*).

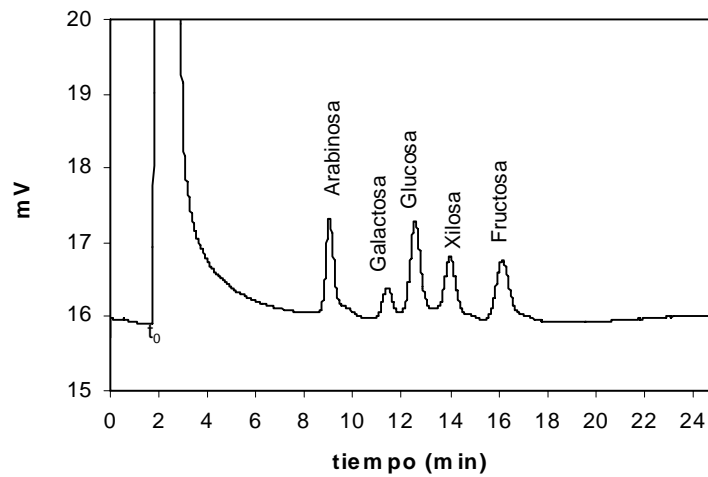


Figura 4: Mezcla de cinco patrones a las concentraciones encontradas en brandy. El perfil es similar al de los brandies del ensayo de envejecimiento.

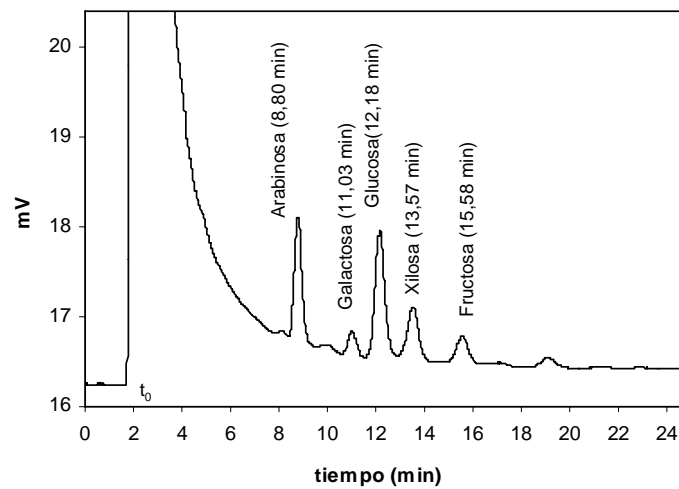


Figura 5: Cromatograma de un brandy del sistema de envejecimiento (T-05) en el que se han identificado los azúcares presentes.

2.2. MANOSA Y XILOSA

La manosa y la xilosa han sido descritas en destilados envejecidos en madera^{4,5,6,7,8,9,10,11,12}. Mediante el método A no es posible separar manosa y xilosa (*figura 6*), mientras que el método B sí es capaz de separar ambos azúcares (*figura 7*), aunque proporciona una única señal para arabinosa y ramnosa^{13,14}. Para averiguar si los brandies del ensayo de envejecimiento contenían xilosa, manosa o una mezcla de ambas, se procedió a analizar cromatográficamente varias muestras de brandy del ensayo de envejecimiento mediante el método B. Los resultados revelaron que la señal cromatográfica proporcionada por el método A era debida únicamente a la xilosa (*figura 8*). En base a los resultados obtenidos, se decidió analizar las muestras de brandy mediante el método A, que presenta varias ventajas con respecto al método B, ya que consume menos tiempo de análisis.

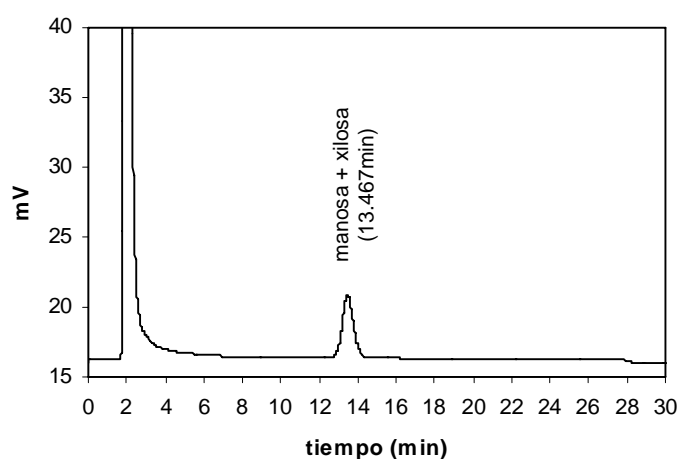


Figura 6: mezcla de manosa y xilosa analizada mediante el método A.

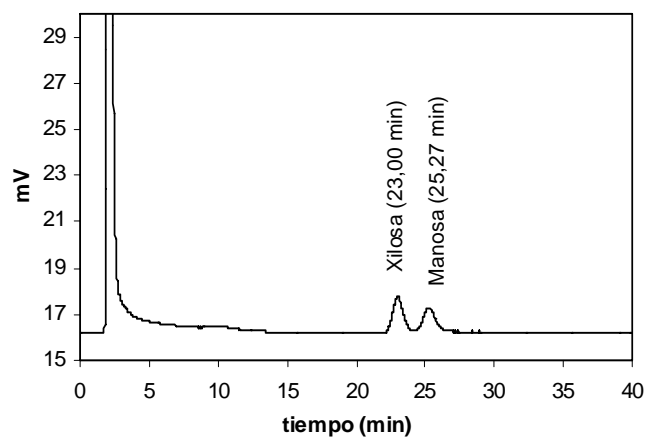


Figura 7: mezcla de manosa y xilosa analizada mediante el método B.

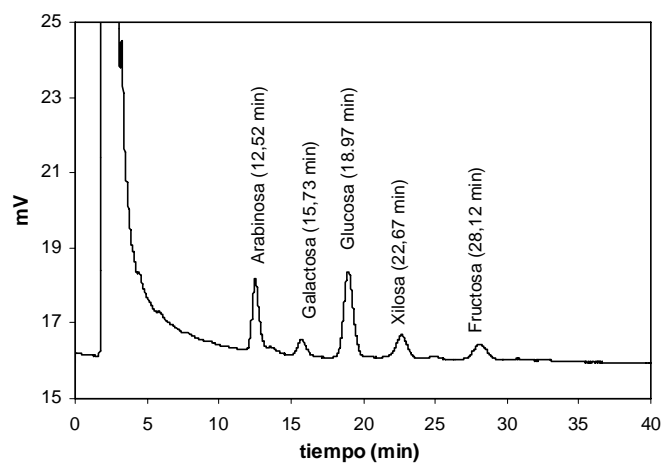


Figura 8: Brandy del ensayo de envejecimiento analizado mediante el método B.

2.3. REPETIBILIDAD

La repetibilidad del método fue medida tanto para el tiempo de retención como para la respuesta del mismo. Para ello se realizaron una serie de análisis sucesivos, en las mismas condiciones (la misma muestra de brandy en diferentes días). Los resultados, expresados como coeficiente de variación (CV, ver fórmula) tanto de los tiempos de retención como de las señales cromatográficas (en unidades de área), para cada uno de los compuestos, se resumen en la *tabla 5*. En todos los casos, los CV son menores o iguales al 5,5 %, con excepción de la repetibilidad en área de la manosa.

$$CV = RSD = \left(\frac{S}{\bar{X}} \right) \cdot 100\%$$

Donde:

CV: Coeficiente de variación.

RSD: Desviación estándar relativa.

S: Desviación estándar.

\bar{X} : Valor medio de las observaciones.

Azúcar	CV %	
	Área	Tiempo de retención
Arabinosa	4,3	3,7
Galactosa	5,0	3,3
Xilosa	5,2	4,9
Manosa	8,4	1,6
Glucosa	5,1	1,9
Fructosa	5,5	5,4

Tabla 5: Repetibilidad en la determinación de azúcares en brandy mediante HPAEC-PAD.

2.4. CARACTERIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN

Los parámetros que se describen a continuación son característicos de la separación obtenida con el método empleado (*tabla 6*). Es preciso mencionar que la manosa fue analizada mediante el método *B*, capaz de separar xilosa y manosa, a diferencia del resto de azúcares, que fueron cuantificados mediante el método *A*.

- Factor de capacidad (K'_i):

$$K'_i = \frac{t_{Ri} - t_0}{t_0}$$

Donde t_{Ri} es el tiempo de retención de la especie i y t_0 (*tiempo muerto*) es el tiempo que tarda una sustancia no retenida por la columna, desde que es inyectada hasta que llega al detector (*ver figura 4*). Para la estimación del parámetro t_0 , se ha calculado el valor medio entre varios cromatogramas. El factor de capacidad expresa la relación entre el tiempo de retención neto ($t_{Ri} - t_0$) y el parámetro t_0 . Los componentes que se desea separar permanecerán un mayor tiempo dentro de la columna que la fase móvil, ya que dichos compuestos interaccionarán con la columna durante el tiempo de retención neto.

- Factor de separación de dos bandas adyacentes ($\alpha_{i,i+1}$):

$$\alpha_{i,i+1} = \frac{K'_{i+1}}{K'_i} = \frac{t_{Ri+1} - t_0}{t_{Ri} - t_0}$$

Si suponemos que el compuesto $i+1$ es retenido con mayor intensidad que i en la columna, el factor de separación nos permite cuantificar el poder de resolución entre esos dos componentes en una columna cromatográfica. El factor de separación de dos bandas adyacentes debe ser mayor que 1, que sería su valor si los tiempos de retención de las dos especies fueran iguales. En todos los casos, el factor de separación fue mayor que 1,12.

- Resolución:

$$R_{i,i+1} = \frac{t_{Ri+1} - t_{Ri}}{\frac{1}{2}(W_{i+1} + W_i)}$$

Donde W_i es el ancho del pico a la mitad de la altura máxima. El parámetro resolución expresa la relación entre la separación de los picos cromatográficos y el ancho medio de los mismos. Por tanto, cuanto mayor sea la resolución, mejor es la separación cromatográfica entre las señales. Dado que la resolución depende del ancho de las señales (no se tiene en cuenta en los dos parámetros descritos anteriormente), variará según la concentración de los analitos, por ello se especifica la concentración de cada uno de ellos a la que se calculó la resolución (correspondientes a un brandy del ensayo de envejecimiento). Para todos los azúcares estudiados, la resolución fue superior a 1,39.

Compuesto	Concentración (g/L)	Factor de capacidad (K')	Factor de separación (α)	Resolución (R)
Arabinosa	11,15	4,36	-	-
Galactosa	3,83	5,69	1,31(ara.-gal.)	2,89 (ara.-gal.)
Glucosa	17,43	6,38	1,12 (gal.-gluc.)	1,39 (gal.-gluc.)
Xilosa	5,10	7,22	1,13 (gluc-xil.)	1,50(gluc-xil.)
Manosa	46,4	22,87	1,31 (man-fruc.)	2,82(man-fruc.)
Fructosa	9,60	8,41	1,16 (xil.-fruc.)	1,85 (xil.-fruc.)

Tabla 6: Factor de capacidad, factor de separación y resolución de los compuestos estudiados.

2.5. ESTANDARIZACIÓN DE LA SEÑAL (CALIBRACIÓN)

En primer lugar se realizó una calibración por patrón externo de cada azúcar a partir del análisis por triplicado de seis disoluciones de patrones de distintas concentraciones. En todos los casos, el intervalo lineal de concentraciones obtenido

incluyó al rango de concentraciones encontradas en los brandies estudiados. Las curvas de calibrado obtenidas, así como los parámetros analíticos característicos de las mismas, vienen reflejados en la *tabla 7*. En esta tabla se añade el calibrado de la manosa, que será posteriormente cuantificada en algunas sustancias de adición. La calibración de la manosa se realizó mediante el método *B*, capaz de separar xilosa y manosa, a diferencia del resto de azúcares, que fueron analizados mediante el método *A*. Los parámetros analíticos reflejados en dicha tabla son los siguientes:

- La curva de calibrado es la recta de regresión de Y (área) sobre X (concentración), obtenida mediante ajuste por el método de mínimos cuadrados.
- SD_a y SD_b son las desviaciones estándar para la pendiente (b) y la ordenada en el origen (a), que reflejan los errores aleatorios de la pendiente y la ordenada en el origen, respectivamente.
- R^2 es el cuadrado del coeficiente de correlación lineal, que estima el grado de ajuste de los datos experimentales a una línea recta.
- La linealidad de un método analítico es su capacidad para producir resultados directamente proporcionales a la concentración de analito dentro de un intervalo dado.
- El límite de detección (LD) es la concentración más baja de analito que produce una señal significativamente distinta del ruido de fondo. Actualmente, está generalizado adoptar como criterio para determinar el límite de detección aquella concentración de analito que proporciona una señal en el instrumento (Y) igual a la señal del blanco (Y_B) más tres veces la desviación estándar del blanco (S_B). Por tanto, el criterio sería: $Y - Y_B = 3S_B$.
- El rango se refiere al intervalo de concentraciones de analito que pueden ser determinadas con la precisión, exactitud y linealidad especificadas.
- La sensibilidad es la capacidad para discriminar entre pequeñas diferencias de concentración del analito. Se evalúa mediante la sensibilidad de calibración, que es la pendiente de la recta de calibrado a la concentración de interés.

Azúcar	Curva de calibrado ($Y = a + b X$)	SD_a	SD_b	R^2	Linealidad	LD (mg/L)	Rango (mg/L)
Arabinosa	$Y = -1136,29 + 8444,87X$	842,5	71,4	1,000	99,2 %	0,60	0,21-21
Galactosa	$Y = -630,75 + 7074,74X$	373,9	55,4	1,000	99,2 %	0,32	0,12-12
Glucosa	$Y = 1309,45 + 7567,70X$	1468,4	94,7	0,999	98,7 %	1,17	0,28-27,6
Xilosa	$Y = -1623,21 + 9535,21X$	391,7	63,5	1,000	99,3 %	0,25	0,11-10,98
Manosa	$Y = 27,26 + 4665,02X$	511,9	81,5	0,998	98,3 %	0,51	0,30-10,00
Fructosa	$Y = 324,88 + 4595,34X$	547,8	67,1	0,998	98,6 %	0,72	0,15-14,52

Tabla 7: Calibración por patrón externo de los azúcares y parámetros relacionados.

Un inconveniente de la calibración por patrón externo es que sólo es válida cuando no existen *efectos de matriz*, es decir, disminución o aumento en la señal analítica debido a la presencia de otros componentes en la muestra. Para evaluar estos efectos, se realizó una calibración mediante el método de adiciones estándar* con un brandy del ensayo de envejecimiento, utilizando el mismo rango que en la calibración externa. La comparación de las pendientes de las rectas de regresión obtenidas mediante calibración externa y adiciones estándar, usando el *test T de Student* y el *test de Cochran*, no presentó diferencias significativas para ninguno de los azúcares a un nivel de significación de 0,05. No existen, por tanto, efectos de matriz, pudiéndose considerar válida la calibración por patrón externo presentada en la *tabla 7*.

2.6. EVOLUCIÓN DE LOS AZÚCARES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

Una vez comprobada la validez del método cromatográfico, se procedió al análisis de las muestras obtenidas en la experiencia de envejecimiento del brandy (*Materiales y métodos*). Los cromatogramas se cuantificaron utilizando los parámetros de la calibración externa. Las concentraciones máximas y mínimas encontradas en los

* Se toman volúmenes iguales de solución problema, pero todas salvo una son “tratadas” por separado con cantidades conocidas y diferentes del analito, y diluidas al mismo volumen.

azúcares estudiados en el sistema de envejecimiento dinámico (Soleras y Criaderas), así como las sacas y escalas correspondientes, vienen reflejadas en la *tabla 9*. En dicha tabla, no se han tenido en cuenta las muestras S01, S05 y S09, que sufrieron una contaminación en el muestreo, ni la S19, que también presentó unas concentraciones extremadamente elevadas, especialmente de glucosa y fructosa. Estas cuatro muestras fueron descartadas de los tratamientos estadísticos posteriores, al ser detectadas como datos discrepantes.

Compuesto	Concentración mínima (mg/L)	Escala y número de saca	Concentración máxima (mg/L)	Escala y número de saca
Arabinosa	2,827	T01	13,734	S15
Galactosa	0,717	T15	3,994	S15
Glucosa	3,616	T19	17,711	S15
Xilosa	0,822	T15 y T19	6,054	S14
Fructosa	1,883	T02	8,815	P19

Tabla 9: Concentraciones máximas y mínimas de azúcares encontradas en los brandies del ensayo de envejecimiento.

En las *figuras 9-13* se recoge la evolución de la concentración de cada uno de los azúcares frente al número de saca en el Sistema de Soleras y Criaderas. Los puntos que aparecen en las gráficas son datos experimentales, mientras que las líneas han sido calculadas mediante media móvil*, utilizando dos periodos. En estas curvas se puede observar que la concentración de los cinco azúcares va aumentando en el brandy hasta llegar a la saca 6-9 (varía según el azúcar y la escala). A partir de la mencionada saca, la concentración de azúcar se estabiliza y disminuye gradualmente en algunos casos, sobre todo con xilosa y galactosa. El número de saca que da comienzo a la estabilización/disminución en las concentraciones (aproximadamente 1,5-2,25 años** desde el comienzo de la experiencia de envejecimiento) depende de la escala y de la diferente cinética de extracción de cada azúcar.

* Media móvil: secuencia de medias calculadas a partir de porciones de una serie de datos. En un gráfico, una media móvil suaviza las fluctuaciones en los datos, mostrando así con más claridad la tendencia.

** 1,5 años = 1 año y 6 meses; 2,25 años = 2 años y 3 meses.

En la *figura 14* se muestra un cromatograma de un aguardiente antes de entrar en el sistema de envejecimiento. Su contenido en azúcares es muy reducido (cantidades mínimas de glucosa y fructosa) e irá aumentando considerablemente al entrar en contacto con las botas. El origen de las pequeñas cantidades de azúcares encontradas en los aguardientes puede explicarse por una contaminación durante el trasvase de los mismos. Dicha contaminación, junto con la observada para glucosa y fructosa en algunas muestras, es arrastrada durante el resto de la experiencia de envejecimiento, siendo responsable de las líneas de evolución irregulares que presentan glucosa y fructosa.

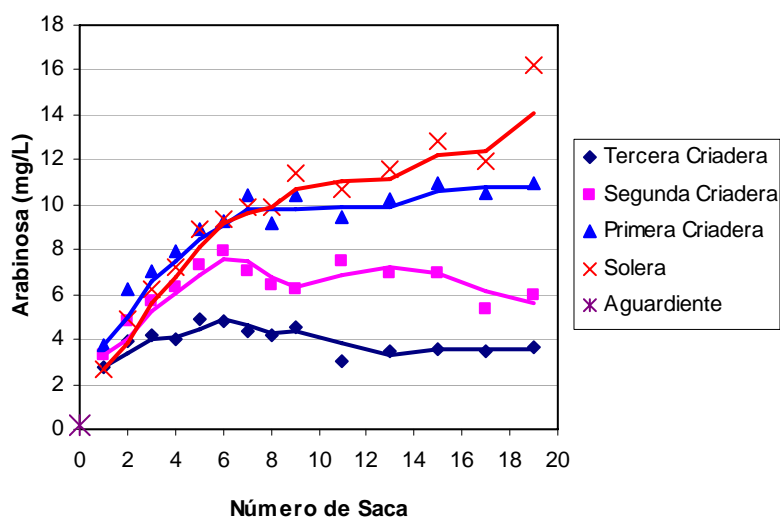


Figura 9: Arabinosa en el sistema de envejecimiento dinámico.

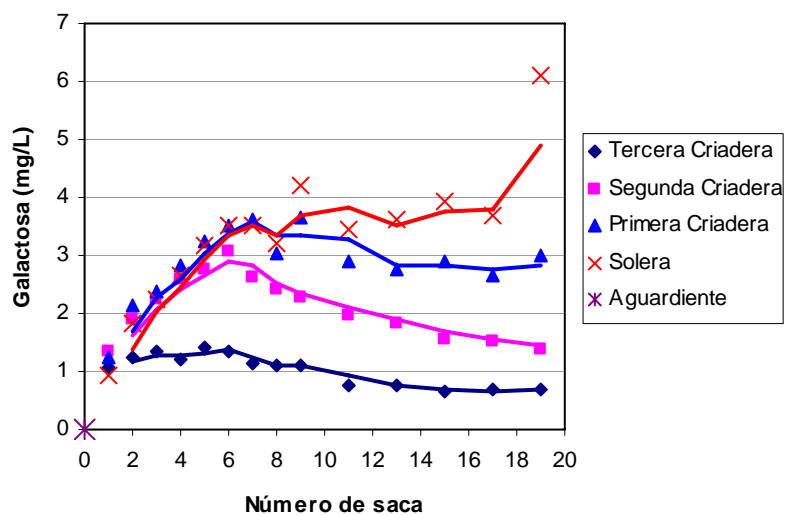


Figura 10: Galactosa en el sistema de envejecimiento dinámico.

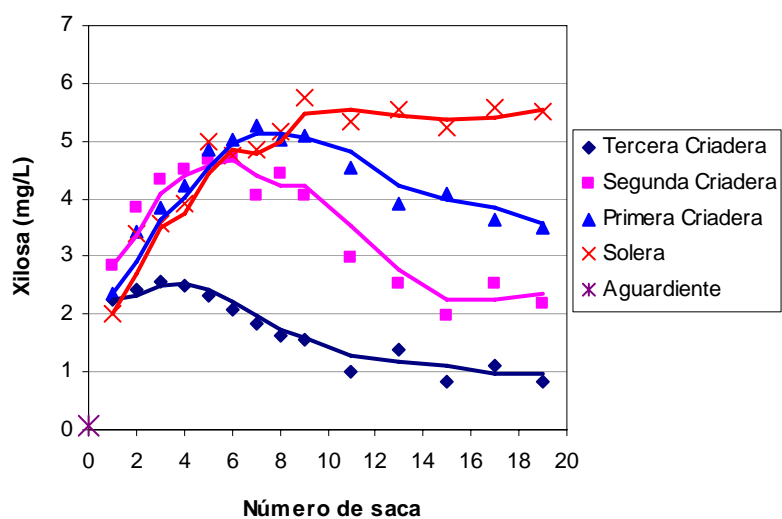


Figura 11: Xilosa en el sistema de envejecimiento dinámico.

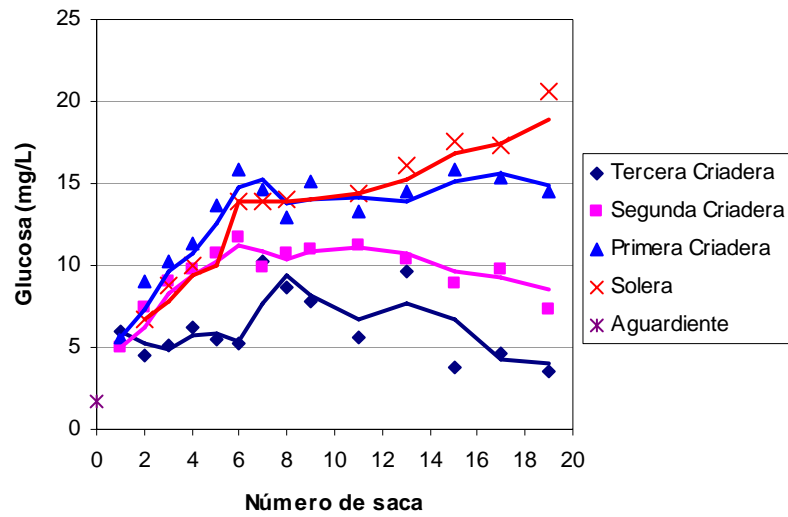


Figura 12: Glucosa en el sistema de envejecimiento dinámico.

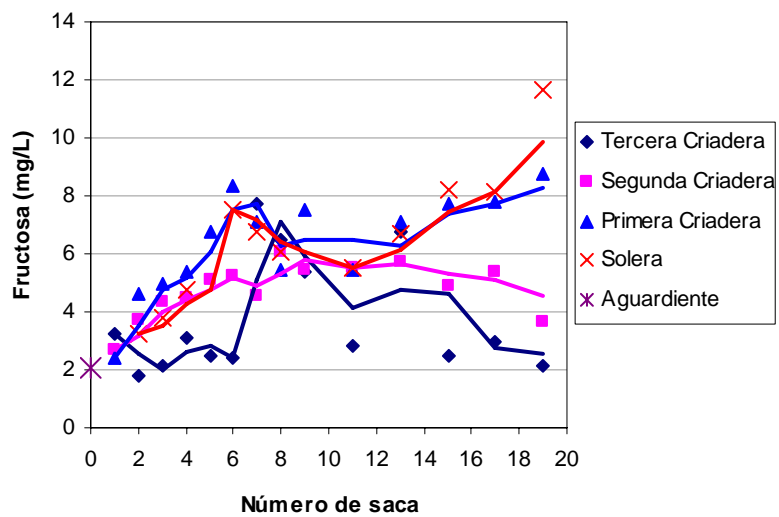


Figura 13: Fructosa en el sistema de envejecimiento dinámico.

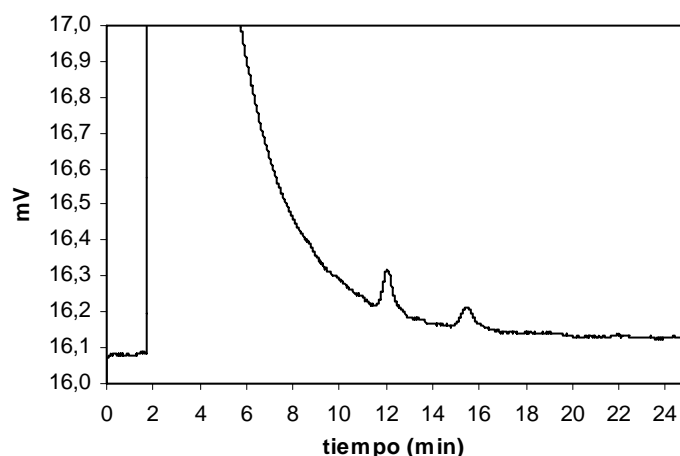


Figura 14: Aguardiente antes de entrar en el sistema de envejecimiento.

El perfil de la curva de extracción está determinado por un conjunto de variables¹⁵:

- Contenido en azúcares de la madera:
 - Propios de su composición (por hidrólisis de las hemicelulosas).
 - Provenientes del envinado de las vasijas.
- Efecto de dilución por mezcla con aguardientes más jóvenes.
- Distinta fuerza extractiva del aguardiente (es mayor cuanto menor sea la concentración de azúcar).
- Distinta cinética de extracción de cada uno de los compuestos.

El aumento inicial de la concentración, común a todos los azúcares, se debe a que el fenómeno de extracción predomina sobre el efecto de dilución que produce la adición de un aguardiente de menor vejez durante las sucesivas etapas de saca y rocío. El fenómeno de extracción es tan importante en la primera parte de la gráfica debido a la elevada fuerza extractiva del aguardiente (motivada por su baja concentración en azúcares) y al elevado contenido en azúcares de las botas.

La estabilización y disminución en la concentración de azúcares a partir de un determinado número de saca, se explica debido a que el efecto de dilución adquiere ahora un papel más importante que la extracción, cuya disminución podría deberse a un agotamiento rápido de las vasijas durante las primeras etapas del envejecimiento y a una disminución en la fuerza extractiva de los aguardientes, cuyos contenidos en azúcares son ahora mayores.

Los azúcares extraídos de las botas por el aguardiente podrían proceder de la hidrólisis de la hemicelulosa de la madera o del envinado de las botas. Este fenómeno alcanza una profundidad considerable en la madera de las botas, por lo que permanece después de las operaciones de lavado y raspado de las mismas, que se realizaron de forma previa a la experiencia de envejecimiento. De esta forma, se plantearían dos comportamientos hipotéticos en función de que los azúcares provengan, mayoritariamente, de la madera de las botas o del envinado de las mismas:

- Si el perfil de la curva de extracción consistiera en un aumento inicial hasta alcanzar un máximo, manteniéndose constante a partir de entonces, supondría, dado que los azúcares no están presentes en los aguardientes de rocío, que el proceso extractivo (solubilidad del analito en la matriz) alcanza un máximo, aunque las vasijas aún contengan azúcares. Por consiguiente, al ir cambiando el medio extractivo (y diluyendo por adición de aguardientes de menor vejez) se vuelve a alcanzar nuevamente el equilibrio.
- Sin embargo, un aumento inicial de la concentración seguido de un descenso, indicaría un agotamiento de los analitos, que impediría que volviera a alcanzarse nuevamente el máximo. Este comportamiento podría explicarse si suponemos que los azúcares, retenidos en la madera durante el envinado, son inicialmente extraídos de las vasijas y posteriormente, debido al flujo de sacas y rocíos, se produce un agotamiento de los mismos.

Los azúcares procedentes del envinado están presentes en la madera en cantidades limitadas, que se agotarían inicialmente (las cantidades disminuirán después por efecto de la dilución por adición de aguardientes de menor vejez), a diferencia de los azúcares que forman parte de la estructura de la madera, que serán cedidos al aguardiente durante todo el proceso de envejecimiento (en mayor medida en los primeros meses, debido a la mayor fuerza extractiva de los aguardientes). Es importante resaltar que los dos comportamientos hipotéticos que se han planteado (extracción de la madera y procedencia del envinado) constituyen dos casos extremos para describir el proceso de extracción de azúcares de la barrica, mientras que el proceso real de extracción sería debido a una contribución mixta de ambos mecanismos.

Si observamos las distintas escalas, la mayor concentración para cada saca suele corresponder a la Solera, seguida de la Primera, Segunda y Tercera criadera, que presenta la menor concentración. Esto era previsible, dado que, en el sistema de envejecimiento descrito, la Solera es la bota que aloja al brandy que ha estado más tiempo en el sistema de envejecimiento, y por tanto que ha podido extraer una mayor cantidad de azúcares de las botas. En función de estos datos, es evidente el agotamiento que muestran, especialmente, la tercera y segunda criadera, cuyas concentraciones de azúcares son muy bajas en las últimas sacas de la experiencia de envejecimiento. Esto nos llevaría a plantear la reposición de las botas de la tercera criadera (la reposición de la solera completa sería extremadamente costosa), que tendría efecto en todo el sistema, para mantener un nivel de extracción constante.

La evolución del contenido en azúcares durante el envejecimiento por el sistema de Añadas se muestra en las *figuras 15-19*. Al igual que en las gráficas del sistema dinámico, los puntos que aparecen en las gráficas son datos experimentales, mientras que las líneas han sido calculadas mediante media móvil, utilizando dos periodos. En el envejecimiento estático (añadas) las concentraciones de los azúcares aumentan durante todo el proceso de envejecimiento, debido a que el aguardiente permanece siempre en la misma bota y no se produce dilución por adición de aguardiente de menor vejez. El aumento en la concentración también se debe a las mermas (derivadas de fenómenos de evaporación y lixiviación del aguardiente, que reducen su volumen), que contribuyen a aumentar la concentración de azúcares.

En el caso de arabinosa y galactosa, las concentraciones de la Añada durante el envejecimiento son menores que las correspondientes a la Solera, última etapa del sistema dinámico, lo que indica que, para estos dos compuestos, la extracción es predominante sobre la dilución en el sistema dinámico. Para xilosa, glucosa y fructosa, a partir de la saca 11, la concentración de azúcares de la añada supera a la Solera, por tanto, para estos azúcares tiene más fuerza el efecto de dilución del sistema dinámico que la extracción.

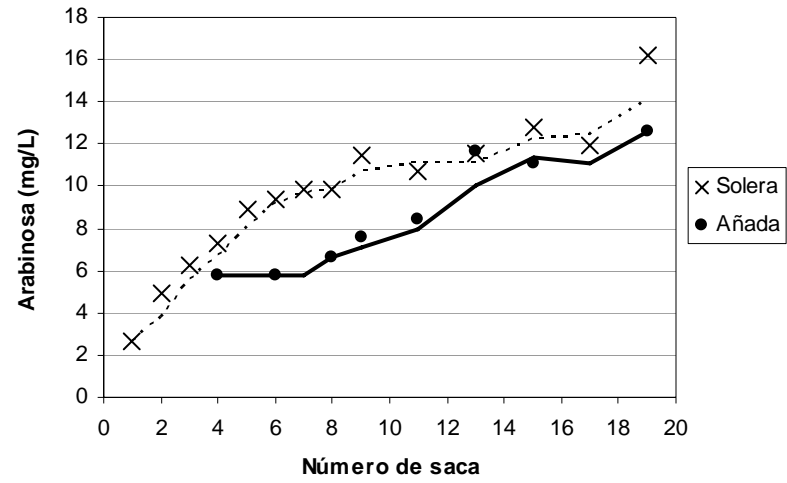


Figura 15: Arabinosa en el sistema de Añadas.

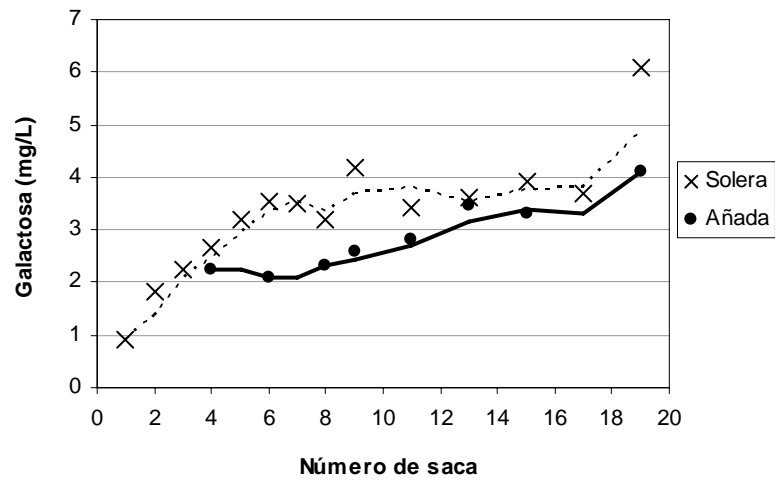


Figura 16: Galactosa en el sistema de Añadas.

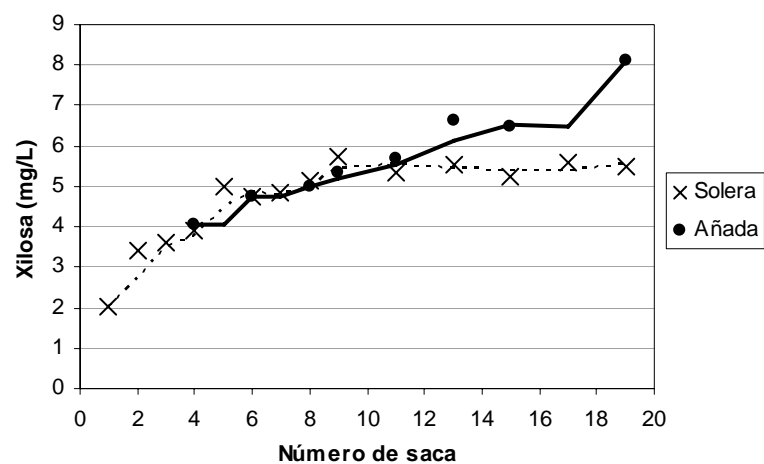


Figura 17: Xilosa en el sistema de Añadas.

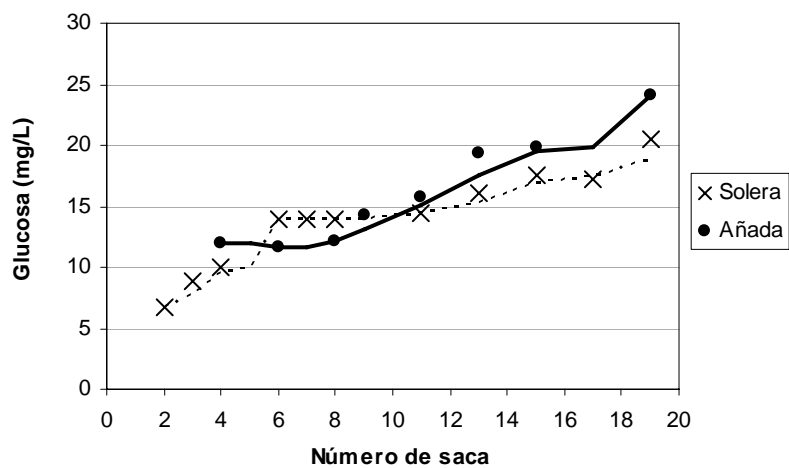


Figura 18: Glucosa en el sistema de Añadas.

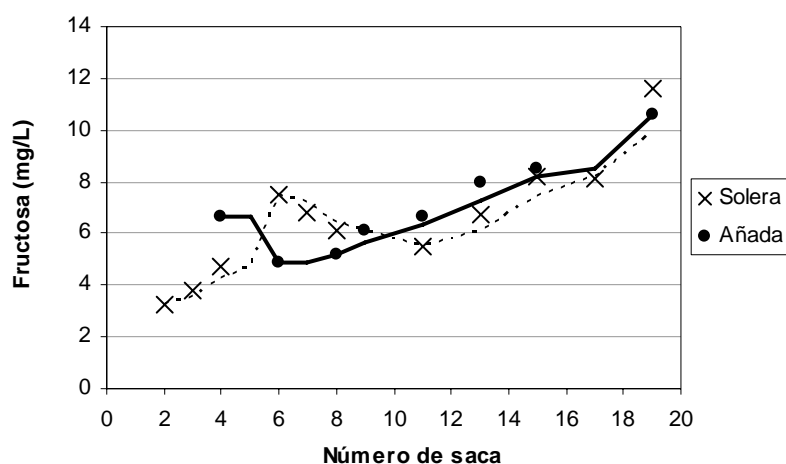


Figura 19: Fructosa en el sistema de Añadas.

2.7. CLASIFICACIÓN DE LOS BRANDIES SEGÚN EL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO

En las gráficas de evolución del contenido en azúcares (*figuras 9-13*), se observa que las curvas correspondientes a la Solera y la Primera criadera tienden a solaparse en la etapa inicial de aumento de concentración. Este solapamiento, que es más acusado para arabinosa, galactosa y xilosa, podría interpretarse si se tiene en cuenta el tiempo medio de envejecimiento, ya que se trata de un sistema de envejecimiento dinámico.

Si observamos la representación gráfica de la vejez media (tiempo medio de envejecimiento) frente al número de Saca para las 4 escalas (*figura 20*), la Solera y la Primera Criadera son las curvas que presentan un mayor solapamiento en las primeras sacas (hasta la saca 6 aproximadamente), lo que podría justificar su solapamiento en las gráficas de Concentración/Nº Saca, ya que se trata de brandies con similares tiempos medios de envejecimiento. Al aumentar el número de saca, comienzan a separarse los tiempos medios de envejecimiento de las cuatro escalas, de manera análoga a como ocurre en las curvas de Concentración/Nº Saca para los distintos azúcares. Esta divergencia se ha medido cuantitativamente mediante Análisis Lineal Discriminante (LDA), teniendo como objetivo la diferenciación de escalas. Las concentraciones de

los cinco azúcares (arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa y fructosa) expresadas en mg/L fueron las variables independientes, mientras que la variable categórica fue la escala (Solera, Primera, Segunda y Tercera Criadera).

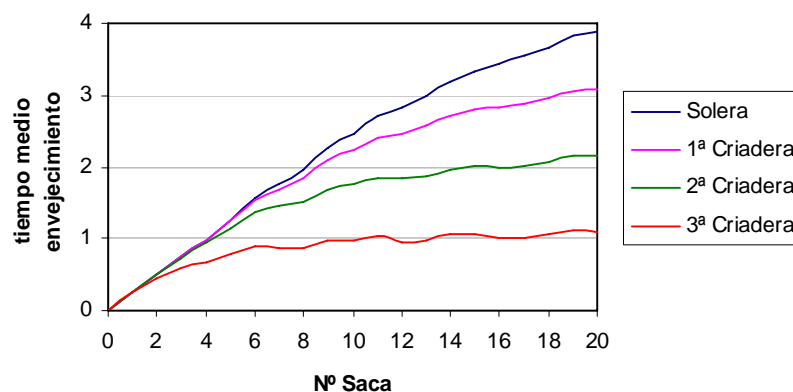


Figura 20: Tiempo medio de envejecimiento frente al número de saca.

Como esta diferenciación es más acusada al aumentar el número de saca, el porcentaje de clasificación entre escalas, considerando todas las sacas (1-19) era más bajo (62,50 %) que teniendo en cuenta las muestras con números de saca superiores a 6 (cuando comienzan a divergir). Los porcentajes de clasificación entre escalas, a partir de la saca 6, se muestran en la *tabla 10*. El 100 % de clasificación entre escalas se consigue utilizando las muestras a partir de la saca 9. La matriz de clasificación para las sacas 9-19 se muestra en la *tabla 11*. La variable con mayor poder de discriminación fue la arabinosa. El gráfico de las muestras sobre el plano de las variables canónicas (*figura 21*) refleja la diferenciación entre las cuatro escalas (S: Solera, P: Primera Criadera, G: Segunda Criadera, T: Tercera Criadera).

Número de saca de las muestras incluidas	Porcentaje correcto de clasificación global
6-19	84,38 %
7-19	92,86 %
8-19	96,00 %
9-19	100,00 %

Tabla 10: LDA para la clasificación entre escalas.

	Porcentaje correcto	T	G	P	S
T	100,00	5	0	0	0
G	100,00	0	6	0	0
P	100,00	0	0	6	0
S	100,00	0	0	0	4
Total	100,00	5	6	6	4

Tabla 11: Matriz de clasificación.

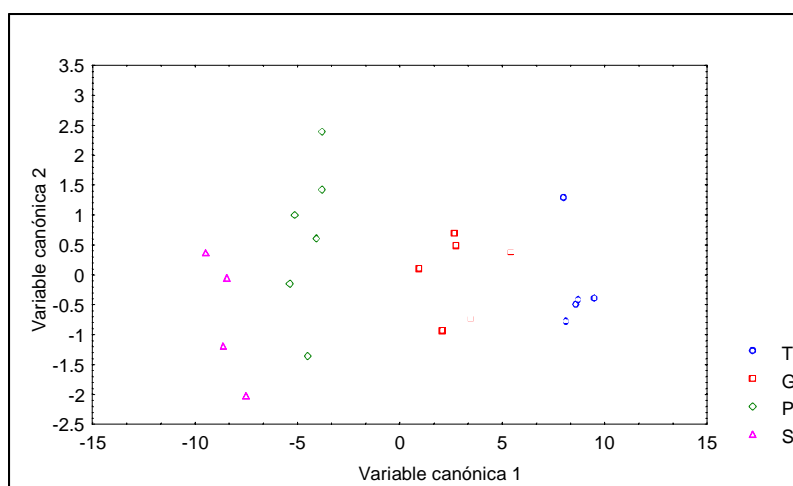


Figura 21: Análisis canónico de la diferenciación por escalas. S: Solera, P: Primera Criadera, G: Segunda Criadera, T: Tercera Criadera.

En función de su vejez media, los brandies se clasifican comercialmente en Solera (más de 6 meses), Solera Reserva (más de un año) y Solera Gran Reserva (más de 3 años) (ver capítulo 1. *Elaboración del Brandy de Jerez*, de los *antecedentes*). Debido a que la concentración de los azúcares estudiados tiene un comportamiento bastante predecible durante el envejecimiento, con claras diferencias entre las muestras pertenecientes a los grupos Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva (*figura 22*), se ha estudiado mediante Análisis Lineal Discriminante la posibilidad de utilizar las concentraciones de azúcares para clasificar los brandies del ensayo de envejecimiento según la denominación comercial de Solera (S), Solera Reserva (SR) y Solera Gran Reserva (SGR). En este caso, la variable independiente sería la denominación comercial de Solera, Solera Reserva o Solera Gran Reserva, mientras que las concentraciones de los azúcares ocuparían el lugar de las variables independientes.

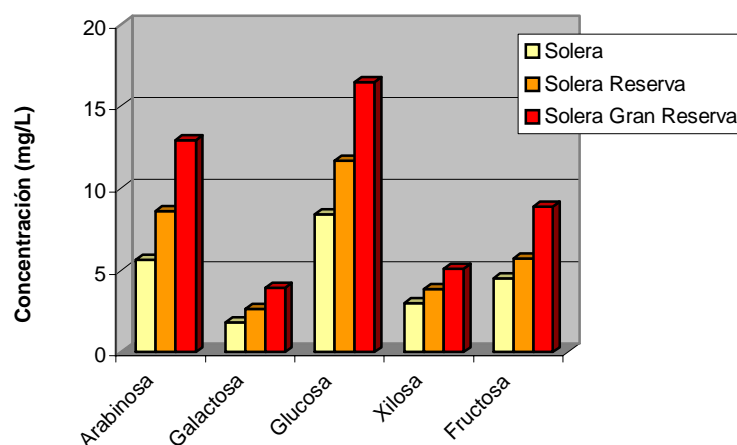


Figura 22: Diferencia entre las concentraciones medias de azúcares de los grupos Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva.

Las concentraciones de los cinco azúcares (arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa y fructosa) se expresaron en mg/L. Los resultados obtenidos mediante el análisis lineal discriminante se muestran en la *tabla 12* (matriz de clasificación). De esta forma, el modelo obtenido pudo clasificar correctamente el 86,67 % de los brandies Solera, el 84,62 % de los Solera Reserva y el 60,00 % de los Solera Gran Reserva. Globalmente, el 82,61 % de las muestras fueron correctamente clasificadas. El porcentaje más bajo

de clasificación corresponde al grupo SGR, lo que puede deberse en parte al pequeño número de muestras disponibles. Las variables con mayor poder de discriminación son fructosa, arabinosa y glucosa, seguidas de xilosa y galactosa. El gráfico de las muestras sobre el plano de las variables canónicas (*figura 23*) refleja la diferenciación entre los tres tipos comerciales (Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva). En las *figuras 24, 25, 26* se muestran los cromatogramas de tres brandies del ensayo de envejecimiento, pertenecientes a los tipos Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva, respectivamente.

	Porcentaje correcto	S	SR	SGR
S	86,67	13	2	0
SR	84,62	4	22	0
SGR	60,00	0	2	3
Total	82,61	17	16	3

Tabla 12: Matriz de clasificación.

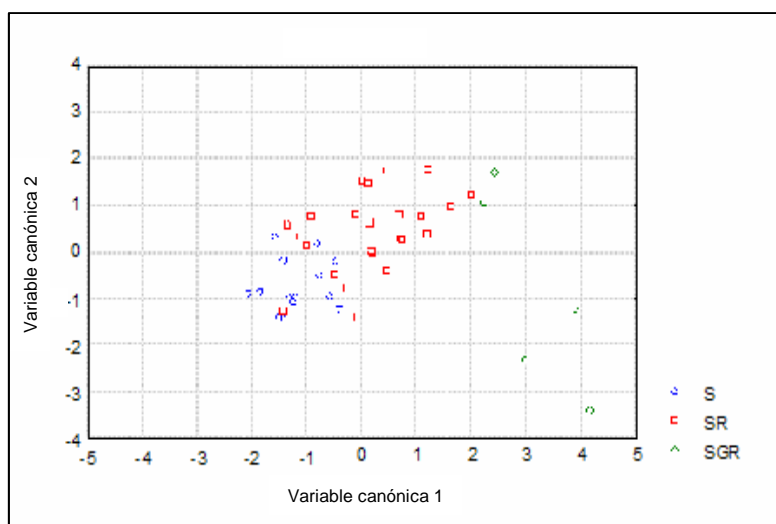


Figura 23: Análisis canónico de la diferenciación por tipos comerciales.

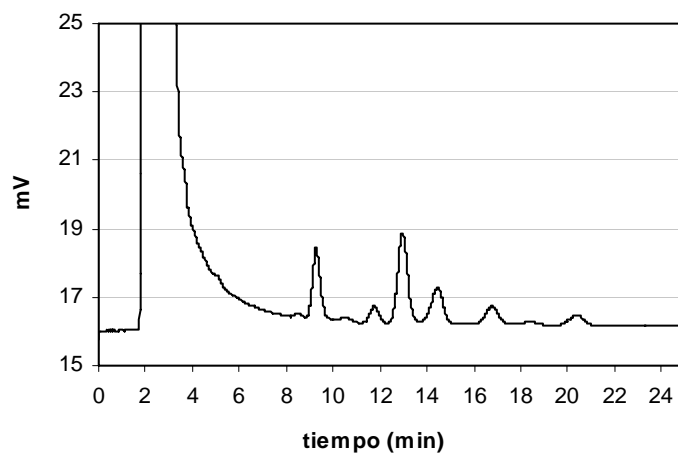


Figura 24: Brandy S03 (Solera) del ensayo de envejecimiento

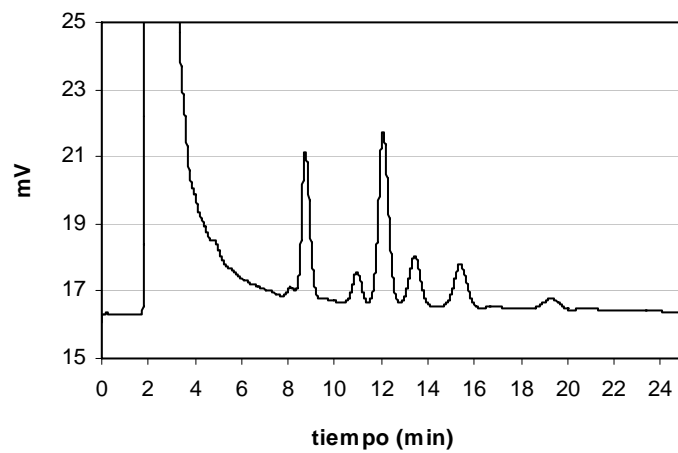


Figura 25: Brandy S12 (Solera Reserva) del ensayo de envejecimiento.

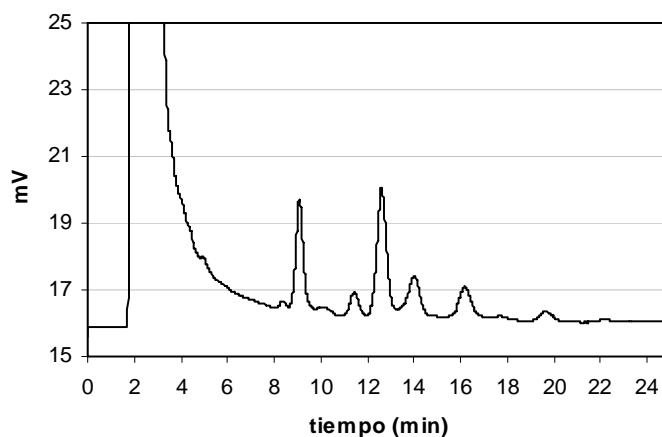


Figura 26: Brandy S18 (Solera Gran Reserva) del ensayo de envejecimiento.

2.8. PREDICCIÓN DEL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO

En vista del elevado porcentaje de clasificación de los brandies proporcionado por las concentraciones de azúcares, y de la validez demostrada por el “tiempo medio de envejecimiento” para estimar la edad de un brandy en el sistema dinámico, la siguiente etapa de este estudio fue tratar de predecir el tiempo medio de envejecimiento de una muestra problema de brandy a partir de sus concentraciones de azúcares. Para ello, se utilizará la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR), ya que la regresión lineal múltiple (MLR) no sería aplicable en este caso, debido a la elevada colinealidad existente entre las variables. La regresión lineal univariante no dio buenos resultados en la estimación del tiempo medio de envejecimiento con ninguno de los azúcares, por lo que se concluyó que todos ellos aportaban información necesaria para este fin. La regresión por redes neuronales artificiales no se ha utilizado en este caso, por tratarse de una matriz de datos muy sencilla (5 variables independientes y una variable dependiente), de forma que el modelo elaborado mediante redes neuronales se aproximaría mucho a una regresión simple.

Las variables independientes que consideramos en el modelo PLS fueron las concentraciones de arabinosa, galactosa, glucosa, xilosa y fructosa. La aplicación de la regresión por mínimos cuadrados parciales con validación cruzada proporcionó un modelo con 5 componentes principales (o factores) y una fiabilidad del ajuste del 94

%, cuyos parámetros se muestran en la *tabla 13*. El elevado coeficiente de correlación para la validación cruzada revela que existe una relación importante entre las concentraciones de azúcares y el tiempo medio de envejecimiento. También es preciso destacar los valores bajos del error cuadrático medio de predicción (RMSEP), tanto para calibración como para validación (0,30 años, es decir, 3,6 meses), que revelan que el modelo tiene una elevada capacidad predictiva y de nuevo confirman la relación entre las concentraciones de azúcares y el tiempo medio de envejecimiento.

	Pendiente	Ordenada en el origen	Coeficiente de correlación	Error cuadrático medio
Calibración	0,90	0,14	0,95	0,27
Validación	0,89	0,16	0,94	0,30

Tabla 13: Parámetros de la regresión por mínimos cuadrados parciales para la predicción del tiempo medio de envejecimiento (años) a partir de las concentraciones de azúcares.

Las variables con mayor contribución al modelo serán aquellas cuyos *loadings* (en valor absoluto) sean más elevados en los primeros componentes principales (factores), que son los que explican una mayor parte de la varianza (*tabla 14*). Según este criterio, las variables de mayor peso en el modelo serán arabinosa (tiene *loadings* elevados en las 4 primeras componentes principales), glucosa y xilosa. Si se comparan estos resultados con los referentes a las clasificaciones según escalas de envejecimiento y categorías comerciales, arabinosa ocupa un papel importante en todos los casos, demostrando ser un azúcar que se encuentra muy afectado por el envejecimiento y que, por ello, tiene una estrecha relación con la vejez del brandy.

	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
Varianza explicada (%)	67,85	85,77	87,15	88,56	89,75
Arabinosa (<i>loadings</i>)	0,59	0,53	0,55	-0,50	0,25
Galactosa (<i>loadings</i>)	0,14	-0,34	0,23	-0,50	-0,65
Glucosa (<i>loadings</i>)	0,71	-0,18	-0,24	0,67	-0,35
Xilosa (<i>loadings</i>)	0,16	-0,75	0,42	-0,26	0,52
Fructosa (<i>loadings</i>)	0,31	-0,07	-0,80	-0,23	0,36

Tabla 14: Loadings o cargas factoriales y porcentaje de varianza explicada (acumulada) de los 5 componentes principales del modelo de regresión por mínimos cuadrados parciales.

En la *figura 27* se muestra la representación gráfica de los valores de tiempo medio de envejecimiento calculados para cada muestra, frente a los estimados mediante mínimos cuadrados parciales. La recta $Y=X$ reflejaría la hipotética coincidencia absoluta entre ambos valores. Se observa la elevada correlación existente, como se pone de manifiesto en los valores de las pendientes (0,90 para calibración y 0,89 para validación).

En conclusión, es posible establecer relación entre el tiempo medio de envejecimiento de una muestra del ensayo de envejecimiento con sus concentraciones de azúcares. Dicha ecuación tiene un coeficiente de correlación de 0,94, por tanto, el 94 % de los cambios en la variable dependiente (tiempo medio de envejecimiento) podrán ser explicados, de forma conjunta, por las variables incluidas en la ecuación de regresión.

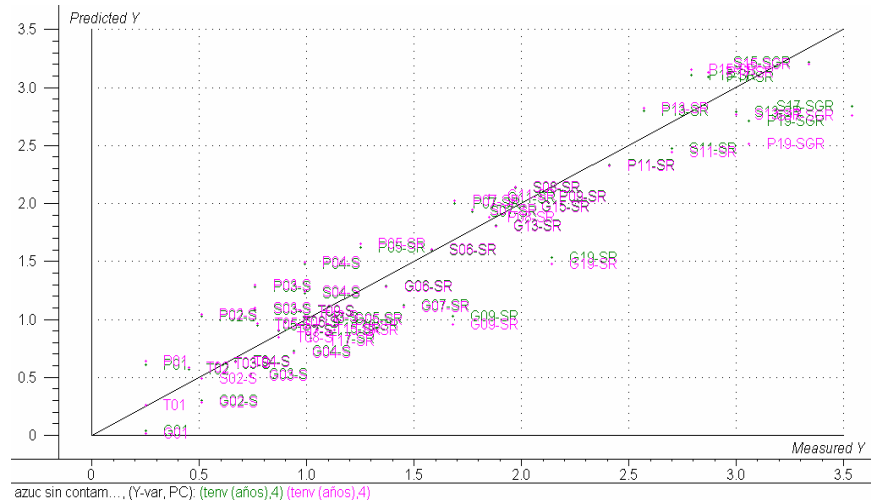


Figura 27: Grado de coincidencia entre los valores medidos y los predichos por el modelo de mínimos cuadrados parciales.

Como conclusión general, el método empleado es aplicable a los brandies del ensayo de envejecimiento, demostrando ser adecuado para la detección y cuantificación de los azúcares presentes en estos brandies. Las concentraciones de estos azúcares demostraron estar directamente relacionadas con el tiempo medio de envejecimiento de los brandies del ensayo experimental, como se pone de manifiesto en los tratamientos estadísticos de diferenciación y regresión realizados a partir del contenido en azúcares.

3. DETERMINACIÓN DE AZÚCARES MAYORITARIOS EN *BRANDIES DE JEREZ* MEDIANTE HPLC-RI

Una vez caracterizado el sistema experimental de envejecimiento en relación al perfil de azúcares, la siguiente etapa de este trabajo fue la determinación de azúcares en *Brandies de Jerez* comerciales. Debido a la elevada sensibilidad del detector amperométrico (HPAEC-PAD) frente al detector de índice de refracción (HPLC-RI), se estudió la posibilidad de aplicar el sistema HPAEC-PAD a los *Brandies de Jerez* comerciales, con el objetivo de cuantificar los azúcares minoritarios (arabinosa, galactosa y xilosa), procedentes en su mayoría del envejecimiento. Sin embargo, esto no fue posible ya que las concentraciones extremadamente elevadas de glucosa y fructosa en estos brandies enmascaran al resto de azúcares minoritarios e impiden su detección. Por este motivo, se utilizará el método optimizado de HPLC-RI, que será previamente validado para la determinación de azúcares mayoritarios en *Brandies de Jerez* comerciales.

Los resultados obtenidos para los *Brandies de Jerez* comerciales serán comparados con los contenidos en azúcares mayoritarios que fueron cuantificados, mediante el mismo método instrumental, en otros destilados envejecidos de distinto origen.

3.1. IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN *BRANDIES DE JEREZ* COMERCIALES

Los azúcares fueron identificados mediante adiciones de las disoluciones de patrones sobre un *Brandy de Jerez* comercial. Estas adiciones revelaron la presencia de glucosa, fructosa y sacarosa, aunque esta última estuvo presente sólo en algunos de los *Brandies de Jerez* estudiados. En la *figura 28* se muestra un cromatograma típico de un *Brandy de Jerez* comercial. En este apartado, el método optimizado de HPLC-RI será también validado para la determinación de sorbitol, compuesto que fue detectado en algunos de los extractos adicionados al brandy envejecido (como se verá en posteriores capítulos) y que no es detectable, en las condiciones estudiadas, por el sistema HPAEC-PAD.

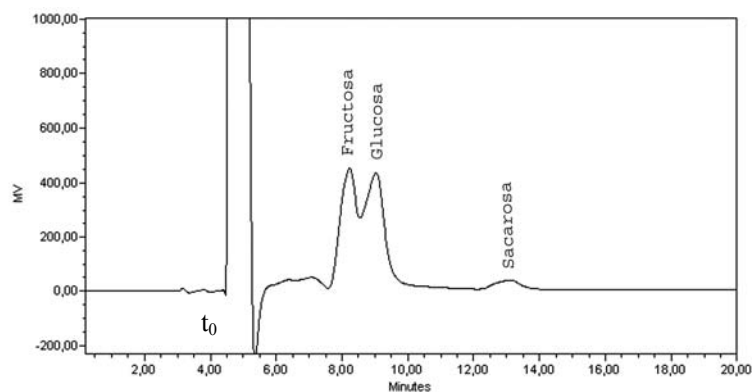


Figura 28: Perfil de azúcares de un Brandy de Jerez comercial analizado mediante HPLC-RI.

3.2. REPETIBILIDAD

La repetibilidad del método fue evaluada mediante análisis sucesivos de la misma muestra de brandy en distintos días. Los resultados se expresaron mediante el coeficiente de variación (CV) de los tiempos de retención y de las señales cromatográficas (en unidades de área) para cada uno de los compuestos (*tabla 15*). Como se observa en esta tabla para los azúcares glucosa, fructosa y sacarosa, los CV son parecidos y menores del 0,6 % para los tiempos de retención y están por debajo del 1,8 % para las áreas de los picos cromatográficos. El sorbitol presentó unos CVs superiores a los tres azúcares anteriores, sobre todo en área (5 %), aunque se consideraron igualmente aceptables.

Compuesto	CV %	
	Área	Tiempo de retención
Glucosa	1,8	0,5
Fructosa	1,6	0,5
Sacarosa	1,5	0,6
Sorbitol	5,0	0,8

Tabla 15: Repetibilidad en la determinación de azúcares mediante HPLC-RI.

3.3. CARACTERIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN

La separación cromatográfica fue evaluada para todos los compuestos estudiados mediante el factor de capacidad (K'), el factor de separación (selectividad, α) y la resolución (R). Los resultados se recogen en la *tabla 16*, donde puede verse que el factor de separación es siempre mayor que 1,2 mientras que la resolución es siempre superior a 1.

Compuesto	Concentración (g/L)	Factor de capacidad (K')	Factor de separación (α)	Resolución (R)
Fructosa	0,6	0,84	1,21 (fructosa-glucosa)	1,24 (fructosa-glucosa)
Glucosa	1,0	1,01	1,17 (glucosa-sorbitol)	1,07 (glucosa-sorbitol)
Sorbitol	0,7	1,19	1,63 (sorbitol-sacarosa)	4,05 (sorbitol-sacarosa)
Sacarosa	0,6	1,94	-	-

Tabla 16: Factor de capacidad, factor de separación y resolución de los compuestos estudiados.

3.4. ESTANDARIZACIÓN DE LA SEÑAL (CALIBRACIÓN)

En primer lugar se realizó una calibración por patrón externo de cada azúcar a partir del análisis por triplicado de varias mezclas de patrones de distintas concentraciones. En todos los casos, el intervalo lineal de concentraciones obtenido incluyó al rango de concentraciones encontradas en los brandies estudiados (y en los extractos para el caso del sorbitol). Las curvas de calibrado obtenidas, así como los parámetros analíticos característicos de las mismas vienen reflejados en la *tabla 17*.

Compuesto	Curva de calibrado ($Y = a + bX$)	SD_a	SD_b	R^2	Linealidad	LD (mg/L)	Rango (mg/L)
Fructosa	$Y = -37033 + 663663X$	38702,3	4198,5	0,999	99,4 %	0,61	0,1-17,99
Glucosa	$Y = -35136 + 741777X$	105282,5	11438,2	0,995	98,5 %	1,49	0,03-17,97
Sorbitol	$Y = -93195 + 730407X$	79509,4	10241,5	0,997	98,6 %	0,95	0,25-15,02
Sacarosa	$Y = -67692 + 709260X$	29057,5	6216,5	0,998	99,1 %	0,43	0,16-10,06

Tabla 17: Calibración externa y parámetros relacionados (HPLC-RI).

Con el objetivo de evaluar la presencia de efectos de matriz, se realizó una calibración mediante el método de adiciones estándar. Posteriormente, se compararon las pendientes de las rectas de calibrado obtenidas por calibración externa y adiciones estándar para cada compuesto usando el *test T de Student* y el *test de Cochran*, lo que confirmó que no existían diferencias significativas entre las varianzas de los residuos ni entre las pendientes de ambas rectas de calibrado, a un nivel de significación de 0,05.

En conclusión, las pendientes de las rectas de regresión obtenidas mediante calibración externa y adiciones estándar no presentaron diferencias significativas para ninguno de los compuestos (nivel de significación de 0,05), lo que indica que no existen efectos de matriz. Por tanto, se puede considerar válida la calibración externa presentada en la *tabla 17*.

3.5. ANÁLISIS DE AZÚCARES MAYORITARIOS EN *BRANDIES DE JEREZ* COMERCIALES

Una vez validado el método cromatográfico, se procedió a la determinación de azúcares mayoritarios (glucosa, fructosa y sacarosa) en las muestras de *Brandies de Jerez* comerciales. Los cromatogramas se cuantificaron utilizando los parámetros de la calibración externa. En la *tabla 18* se muestran las concentraciones encontradas para los tres azúcares en las categorías comerciales de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva de los *Brandies de Jerez* comerciales. También se han incluido las concentraciones medias de glucosa y fructosa de los brandies del sistema experimental

de envejecimiento, para facilitar la comparación entre ambos (la sacarosa no fue detectada en los brandies del ensayo de envejecimiento).

Si se tienen en cuenta las unidades de concentración en la *tabla 18*, se observa que las cantidades de glucosa y fructosa aumentan en tres órdenes de magnitud al pasar del sistema experimental de envejecimiento a los *Brandies de Jerez* comerciales, además de observarse la aparición de sacarosa, que no se detectó en los brandies del ensayo de envejecimiento. Este cambio en el perfil de azúcares al pasar de los brandies del sistema piloto de envejecimiento a *Brandies de Jerez* comerciales se pone de manifiesto al comparar los cromatogramas de ambos (*figuras 5 y 28*). El importante aumento de glucosa y fructosa, a la vez que la aparición de la sacarosa, son atribuidos a la adición de extractos hidroalcohólicos, maceraciones y colorantes caramelo (como se verá en el capítulo siguiente), que se realiza después de la etapa de envejecimiento.

Se observa un aumento en el contenido de glucosa y fructosa cuando pasamos del grupo Solera al Solera Reserva, mientras que en este último los contenidos en ambos azúcares son muy parecidos a los del Solera Gran Reserva. Las cantidades de sacarosa, sin embargo, son mucho mayores para el Solera que para las otras dos categorías. Como resultado de aplicar un análisis de la varianza a los datos de la *tabla 18*, no se detectaron sin embargo diferencias significativas entre las concentraciones de glucosa ($p = 0,349$), fructosa ($p = 0,565$) o sacarosa ($p = 0,073$) de los *Brandies de Jerez* comerciales para las tres categorías (Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva), mientras que los brandies del ensayo de envejecimiento sí presentaron diferencias significativas entre dichas categorías para glucosa ($p = 0,0001$) y fructosa ($p = 0,00008$), como se deduce de las regresiones y análisis clasificatorios realizados en el capítulo previo para estas muestras.

Sistema piloto de envejecimiento (mg/L)					Brandies de Jerez comerciales (g/L)				
	Media	Mínimo	Máximo	C.V.	Media	Mínimo	Máximo	C.V.	
Glucosa	S	8,43	5,32	11,52	23,04	5,97	2,25	11,34	37,31
	SR	11,66	3,62	16,24	32,14	7,07	1,83	14,30	46,68
	SGR	15,63	13,22	17,71	12,23	7,22	1,76	15,37	47,48
Fructosa	S	4,54	2,25	7,81	34,67	5,21	1,85	10,81	40,26
	SR	5,71	2,25	8,38	28,97	5,97	1,12	13,22	51,68
	SGR	8,31	7,56	8,82	6,00	5,90	1,30	10,08	39,91
Sacarosa	S	-	-	-	-	1,09	0,18	3,46	124,71
	SR	-	-	-	-	0,30	0,13	0,58	59,64
	SGR	-	-	-	-	0,22	0,14	0,38	38,12

Tabla 18: Concentraciones medias de glucosa, fructosa y sacarosa en Brandies de Jerez comerciales (g/L) y del ensayo experimental de envejecimiento (mg/L).

3.6. ANÁLISIS DE AZÚCARES MAYORITARIOS EN DESTILADOS ENVEJECIDOS DE DISTINTO ORIGEN

Una vez determinado el contenido en azúcares de los *Brandies de Jerez* comerciales, se procedió a cuantificar estos compuestos en destilados envejecidos de distinto origen (brandies nacionales sin denominación, brandies sudafricanos, cognacs, armagnacs y otros brandies franceses sin denominación), con el objetivo de comparar el perfil cualitativo y cuantitativo de estos destilados con los *Brandies de Jerez* comerciales. Los cromatogramas de estos destilados fueron similares a los obtenidos para los *Brandies de Jerez*: estuvieron dominados por la presencia de glucosa y fructosa, mientras que la sacarosa sólo estuvo presente en algunos de ellos (*figura 29*).

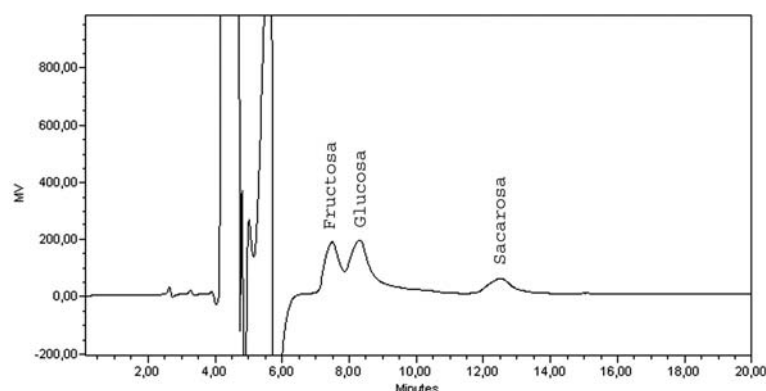


Figura 29: Cromatograma de un brandy francés obtenido mediante HPLC-RI.

En la *tabla 19* se presentan las concentraciones medias de azúcares encontradas en destilados envejecidos de distinto origen, junto con las correspondientes a los *Brandies de Jerez* comerciales. Como se observa en la tabla, no se encontró sacarosa en ninguno de los cognacs y armagnacs analizados, y sólo en uno de los brandies sudafricanos, en cuyo caso el valor medio corresponde al único valor encontrado, por lo que no se pueden proporcionar medidas de la dispersión entre muestras.

			Media	Mínimo	Máximo	C.V.
<i>Brandies de Jerez</i>	S	Glucosa	5,97	2,25	11,34	37,31
		Fructosa	5,21	1,85	10,81	40,26
		Sacarosa	1,09	0,18	3,46	124,71
	SR	Glucosa	7,07	1,83	14,30	46,68
		Fructosa	5,97	1,12	13,22	51,68
		Sacarosa	0,30	0,13	0,58	59,64
	SGR	Glucosa	7,22	1,76	15,37	47,48
		Fructosa	5,90	1,30	10,08	39,91
		Sacarosa	0,22	0,14	0,38	38,12
Otros brandies españoles (ES)		Glucosa	5,86	0,33	13,05	64,02
		Fructosa	5,26	0,22	12,16	68,05
		Sacarosa	3,29	0,16	7,41	113,25
Cognacs (CO)		Glucosa	4,88	3,68	6,68	21,08
		Fructosa	4,26	2,80	6,32	25,69
		Sacarosa	-	-	-	-
Armagnacs (AR)		Glucosa	2,40	0,22	3,92	64,95
		Fructosa	1,71	0,06	2,79	68,19
		Sacarosa	-	-	-	-
Otros brandies franceses (FR)		Glucosa	3,03	1,89	4,51	38,25
		Fructosa	2,17	1,44	2,85	30,82
		Sacarosa	0,61	0,42	0,80	44,91
Brandies Sudafricanos (SD)		Glucosa	3,09	1,98	3,63	24,74
		Fructosa	2,25	1,72	2,51	16,09
		Sacarosa	0,20	-	-	-

Tabla 19: Concentraciones medias (g/L) de glucosa, fructosa y sacarosa en *Brandies de Jerez* comerciales y en otros destilados envejecidos de distinto origen.

En la *figura 30* se comparan las concentraciones medias de los tres azúcares para cada uno de los destilados, incluidos los tres tipos de *Brandies de Jerez* comerciales. Las concentraciones más elevadas de glucosa y fructosa corresponden a los *Brandies de Jerez* Solera Gran Reserva y Solera Reserva, respectivamente, seguidos muy de cerca por los Solera Reserva (para la glucosa) y Solera Gran Reserva (para la fructosa). Los brandies españoles sin denominación presentaron las cantidades más elevadas de sacarosa, que fueron a su vez mucho mayores que las del resto de destilados, incluidos los *Brandies de Jerez*. El análisis de la varianza de las muestras de la *tabla 19* reveló la existencia de diferencias significativas entre las concentraciones de glucosa ($p = 0,0033$) y fructosa ($p = 0,0002$) de los destilados de distinto origen y los tres tipos de *Brandies de Jerez*. La sacarosa sólo fue detectada en algunos de los destilados estudiados, por lo que no pudieron aplicarse tests estadísticos.

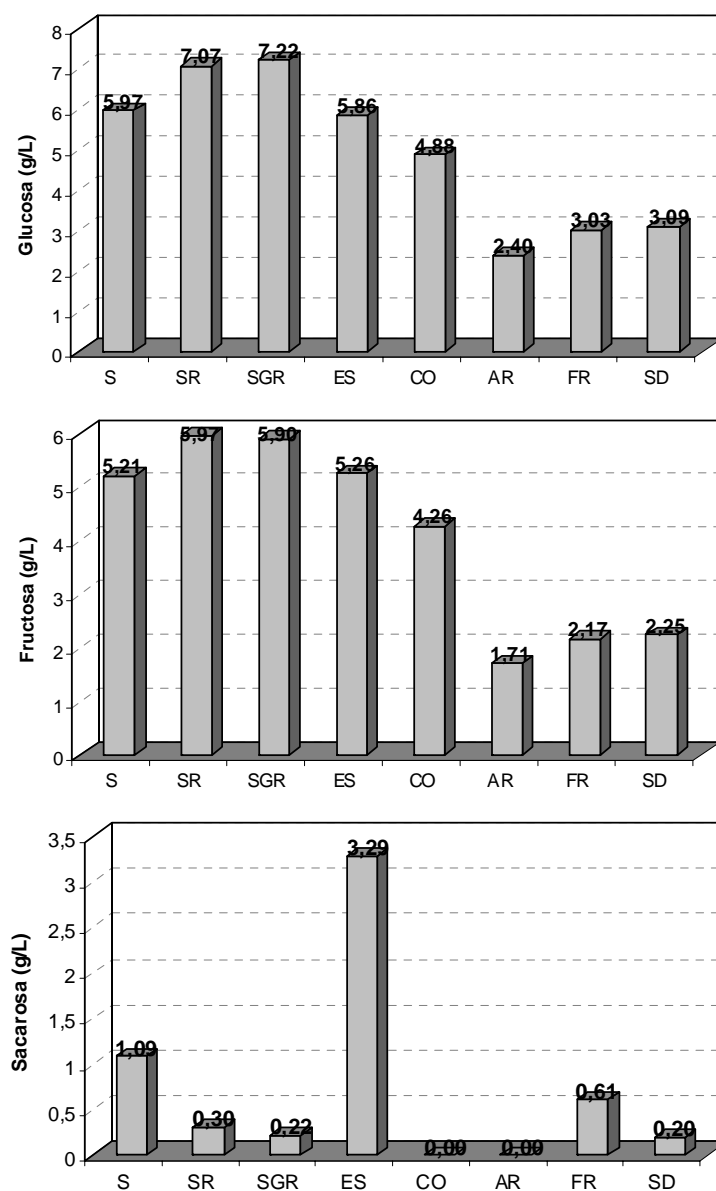


Figura 30: Comparación de las cantidades medias de glucosa, fructosa y sacarosa de destilados envejecidos de distinto origen (abreviaturas en tabla 28) y Brandies de Jerez.

La variación dentro de cada grupo de bebidas se ha medido a través del coeficiente de variación. La mayor dispersión en las cantidades de glucosa y fructosa se ha encontrado en armagnacs y brandies españoles de otras zonas, mientras que la sacarosa presentó la máxima variación en los *Brandies de Jerez* Solera y brandies españoles de distinto origen. Es preciso tener en cuenta que la variación del contenido de sacarosa no ha podido medirse para cognacs y armagnacs, en los que no se detectó este compuesto, ni en los brandies sudafricanos, ya que sólo uno de ellos contenía sacarosa.

Aparte de las concentraciones de azúcares, también se ha estudiado la relación glucosa/fructosa (figura 31), con el objetivo de encontrar parámetros que sean capaces de diferenciar los destilados sin verse afectados por las concentraciones absolutas de azúcares. Los valores más altos de esta relación glucosa/fructosa se registraron en los armagnacs. Los *Brandies de Jerez* comerciales presentan valores intermedios, similares a los del resto de destilados. El análisis de la varianza reveló diferencias significativas ($p = 0,009$) en la relación glucosa/fructosa de los destilados (incluidos los *Brandies de Jerez*), lo que también se había observado utilizando las concentraciones de ambos azúcares por separado.

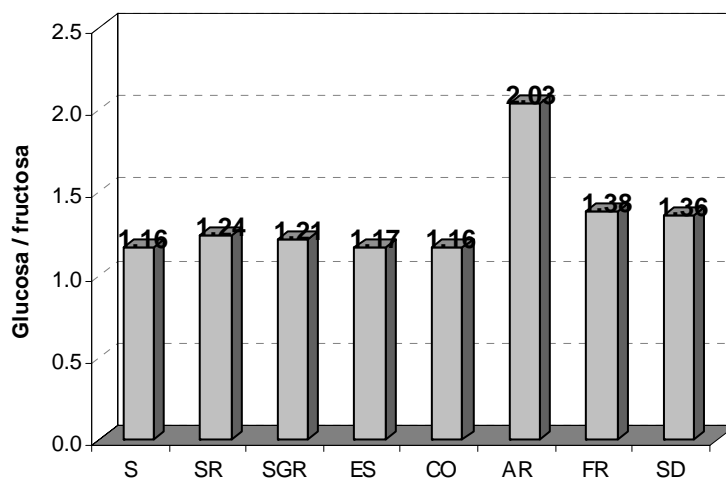


Figura 31: Comparación gráfica de la relación glucosa/fructosa en *Brandies de Jerez* comerciales y en otros destilados envejecidos de distinto origen (abreviaturas en tabla 14).

4. ANÁLISIS DE EXTRACTOS, MACERACIONES Y COLORANTE CARAMELO MEDIANTE HPLC-RI Y HPAEC-PAD

La legislación recoge una práctica tradicional como es la adición de maceraciones aromáticas de frutas para dar tipicidad y carácter diferenciador a cada producto. Asimismo, la legislación recoge la edulcoración con azúcares naturales, como el vino dulce, y el ajuste del color final del producto con colorante caramelo (de sacarosa, de glucosa o de mosto de uva).

En este capítulo se estudiará el contenido en azúcares de macerados e infusiones hidroalcohólicas aromáticas de uvas pasas, ciruelas pasas, vainas de vainilla, cortezas de nueces verdes, virutas de madera de roble (tostado -T- y sin tostar -A- y -C-) y pericarpios de almendras. También se analizaron caramelos de de sacarosa, de glucosa y de mosto de uva. Todas estas sustancias se consideran hipotéticamente responsables del cambio en el perfil de azúcares que se produce al pasar de los brandies del ensayo experimental de envejecimiento a los *Brandies de Jerez* comerciales. Para su determinación, se combinarán las dos técnicas cromatográficas utilizadas hasta ahora: HPAEC-PAD permitirá la cuantificación de compuestos minoritarios, mientras que HPLC-RI se utilizará para determinar compuestos mayoritarios. A partir de la composición cualitativa y cuantitativa de estas sustancias y de las relaciones entre ellas, se evaluará el efecto que tienen sobre el brandy y se sugerirán posibles marcadores de la adición de algunas de estas sustancias así como del envejecimiento en bota del brandy.

4.1. IDENTIFICACIÓN DE AZÚCARES EN EXTRACTOS, MACERACIONES Y CARAMELOS

La identificación de azúcares en estas sustancias se realizó, de forma similar a como se hizo en anteriores capítulos, mediante adiciones de azúcares. De esta forma, se pudieron identificar los azúcares presentes en los distintos extractos, maceraciones, vinos dulces y caramelos, que aparecen en las *figuras 32-36* (el método utilizado se indica en la leyenda). Si dos o más de estas sustancias presentan cromatogramas similares, se mostrará únicamente uno de ellos como figura, indicándose en la leyenda a qué extracto/s o caramelo/s corresponde. En caso de utilizarse el sistema HPAEC-PAD, las muestras fueron analizadas en primer lugar con el método A (más corto que el B) y, en caso de detectarse evidencia de la presencia de xilosa, manosa o una mezcla de ambas (ambos compuestos solapan con el método A), se procedió a analizar la muestra con el método B, capaz de separar ambos azúcares.

El Consejo Regulador de la Denominación Específica *Brandy de Jerez* establece, para la práctica tradicional de adición de extractos y colorante caramelo como acabado en la elaboración del producto, el *quantum satis* de la Unión Europea como dosis admitida, es decir, se añaden en las cantidades que se consideren necesarias para el fin que se persigue, según un código de buenas prácticas de elaboración. Las concentraciones a las que se analizaron los extractos y maceraciones corresponden a las proporciones en las que son habitualmente adicionados al brandy en las bodegas, según datos proporcionados por el Consejo Regulador de la Denominación Específica. En el caso del caramelo, no existe ninguna dosis habitual, ya que la adición se realiza hasta conseguir el estándar de color con el que se comercializa el brandy. Por ello, las disoluciones de colorantes caramelo se analizaron todas en la misma concentración (0,3 g/L).

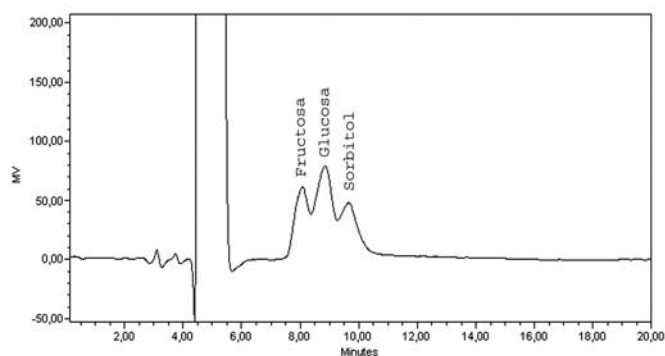


Figura 32: Extracto de ciruelas pasas (HPLC-RI).

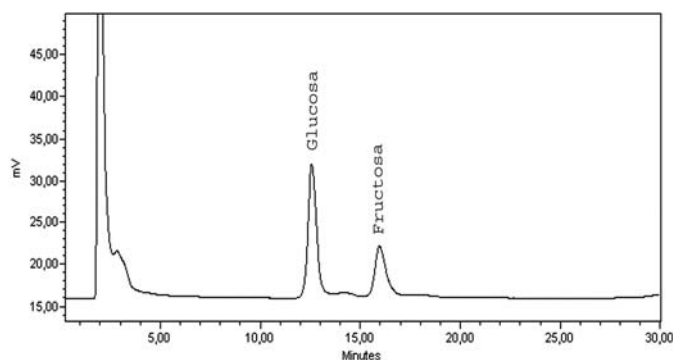


Figura 33: Extracto de uvas pasas / vainas de vainilla / pericarpio de almendras / cáscara de nueces (HPAEC-PAD, método A).

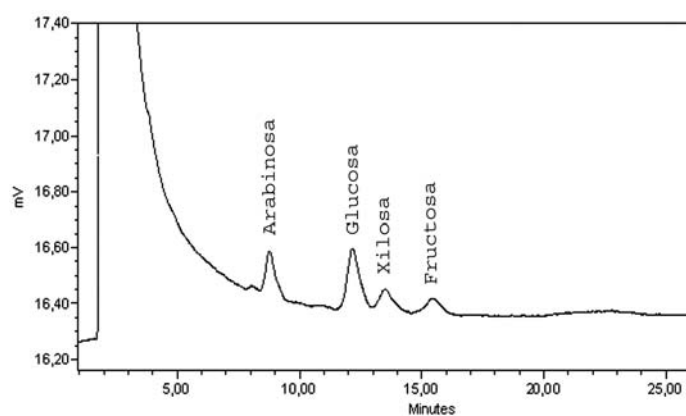


Figura 34: Extracto de roble no tostado (HPAEC-PAD, método A).

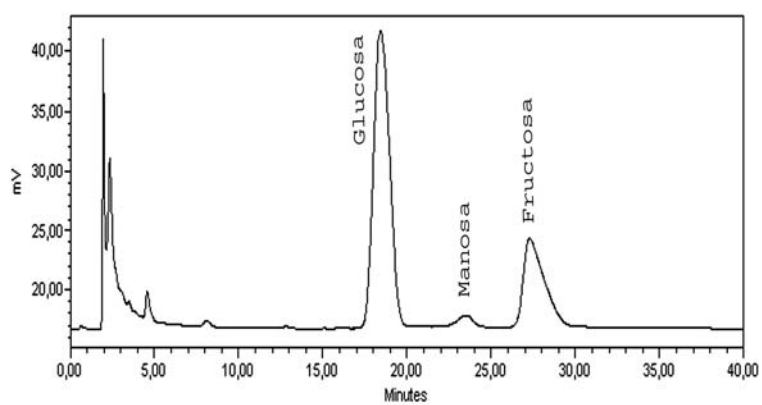


Figura 35: Caramelo de glucosa / caramelo de sacarosa / caramelo de mosto (HPAEC-PAD, método B).

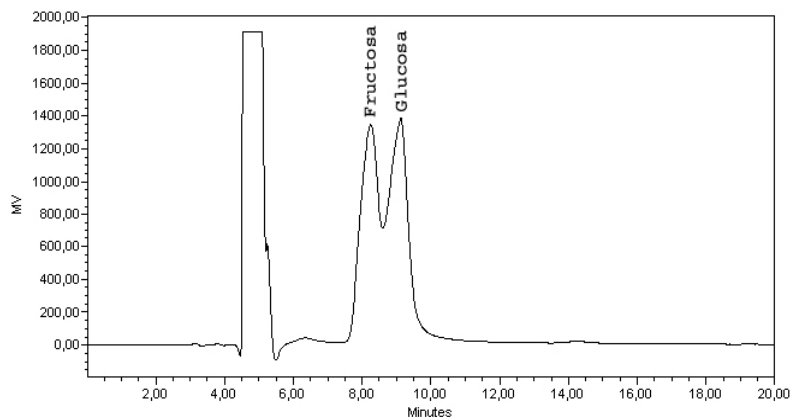


Figura 36: Pedro Ximénez (HPLC-RI).

Como se observa en estas figuras, los vinos dulces y los extractos de pasas, vainilla, almendras y nueces contienen únicamente glucosa y fructosa. El extracto de ciruelas también contiene glucosa y fructosa pero acompañadas del sorbitol, que sólo fue detectado en este extracto (tampoco se encontró en los vinos dulces ni en los caramelos). Este compuesto, cuya presencia en ciruelas frescas y ciruelas pasas ha sido descrita en la bibliografía^{16,17}, fue determinado mediante HPLC-RI, debido a que el sistema HPAEC-PAD no es capaz de detectarlo. De esta forma, la presencia de sorbitol en el brandy podría ser un indicativo de la adición de extracto de ciruelas durante la elaboración.

Los caramelos de glucosa, de sacarosa y de mosto contienen glucosa, fructosa y manosa. La manosa puede ser detectada por ambos sistemas (HPAEC-PAD y HPLC-RI), pero a diferentes rangos de concentración. En este caso, las bajas concentraciones de manosa encontradas en el colorante caramelo sólo pudieron ser cuantificadas por HPAEC-PAD. La manosa no se encontró en los brandies del ensayo de envejecimiento ni en ningún otro extracto, caramelo o vino dulce, por lo que procede únicamente del caramelo. La existencia de fructosa y manosa en el caramelo de glucosa (aparte de la glucosa residual) puede ser explicada mediante la reacción de *Lobry de Bruyn-Alberda van Ekenstein*, que consiste en una enolización de la D-glucosa, que tiene como resultado una isomerización a la correspondiente 2-cetosa (D-fructosa) y una epimerización C-2 a D-manosa. A pesar de que esta reacción de enolización esté favorecida en medio básico, también ocurre bajo catálisis ácida. Según Ratsimba, V. et al.¹⁸, la acidez inherente del caramelo podría proporcionar el medio ácido necesario

para que se produzca la reacción. Es preciso señalar que, a pesar del elevado pH al que se lleva a cabo el análisis cromatográfico, los ensayos descritos en la bibliografía sobre el cromatógrafo utilizado, encaminados a verificar si se producía esta reacción durante el análisis, no encontraron evidencias de la misma, probablemente debido a que la cinética de la reacción sea lenta a temperatura ambiente y no ocurra en una extensión importante durante el tiempo que dura el análisis cromatográfico¹⁹. Fructosa y manosa (además de glucosa) también están presentes en el caramelo de sacarosa. Según Ratsimba, V. et al.¹⁸ esto se debe a que la hidrólisis de la sacarosa probablemente precede a la caramelización de la misma. Esta afirmación es apoyada por el trabajo de Šimkovic, I. et al.²⁰, en el que se concluye que la ruptura del enlace glicosídico es la primera reacción en la degradación térmica de la sacarosa, de forma que, después de 30 minutos de calentamiento, no existe sacarosa en el medio de reacción. Esto explicaría la ausencia de este disacárido en el caramelo de sacarosa. El mosto de uva contiene glucosa y fructosa, lo que justificaría la presencia de glucosa, fructosa y manosa en el caramelo resultante.

Los extractos de roble, como era de esperar, tienen un perfil de azúcares muy similar al de los brandies del sistema de envejecimiento, con excepción de la galactosa, que no está presente en estos extractos. En el roble tostado, sin embargo, no se encontraron ninguno de los compuestos estudiados, probablemente debido a la degradación térmica durante el proceso de tostado. Arabinosa y xilosa no están presentes en el resto de extractos, caramelos o vinos dulces, por tanto son características de los extractos de roble y del envejecimiento en bota del brandy. En este sentido, no se encontró galactosa en ninguna de las sustancias estudiadas (extractos, caramelos y vinos dulces). Este azúcar sólo estuvo presente en los brandies del ensayo experimental de envejecimiento. La ausencia de galactosa en los extractos de roble no podría afirmarse con certeza a partir de los resultados obtenidos, ya que podría ser consecuencia de un límite de detección alto en relación a las concentraciones de adición de los extractos. Estos extractos son elaborados mediante métodos de extracción más agresivos que el envejecimiento en bota, que presumiblemente permitirían una mayor extracción de compuestos.

4.2. PERFIL CUANTITATIVO DE AZÚCARES EN EXTRACTOS, MACERACIONES Y CARAMELOS

La *tabla 20* muestra los contenidos en azúcares de las maceraciones, extractos, caramelos y vinos dulces analizados, mediante la combinación de HPAEC-PAD y HPLC-RI, en las dosis habituales utilizadas en bodegas (los caramelos, cuya dosis es variable, fueron analizados a 0,3 g/L). Las concentraciones medidas con HPAEC-PAD

están expresadas en mg/L, mientras que las concentraciones que aparecen en g/L fueron cuantificadas mediante HPLC-IR. En el caso de los vinos dulces, se presentan las concentraciones medias, ya que se analizaron 8 muestras. Las concentraciones que aparecen en negrita en la *tabla 20* fueron cuantificadas con el detector de índice de refracción, mientras que el resto fueron determinadas mediante HPAEC-PAD. Las celdas con un guión indican que esas concentraciones no pudieron determinarse (azúcares minoritarios), mientras que una concentración de *cero* indica que ese compuesto no estaba presente en la muestra/s analizada/s. Para facilitar la comparación, se han añadido a la tabla las concentraciones medias de los brandies Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva, tanto comerciales como procedentes del ensayo experimental de envejecimiento. Es preciso mencionar, ya que se pone de manifiesto en los cromatogramas de los extractos, que los vinos dulces fueron analizados (mediante HPLC-RI) a concentraciones superiores a las utilizadas en *Brandies de Jerez*, para facilitar la identificación de compuestos y su cuantificación, mientras que los extractos de ciruelas y de pasas fueron diluidos de forma previa al análisis (mediante HPAEC-PAC) para evitar la saturación del detector.

Los perfiles cuantitativos revelan que la mayor aportación de glucosa y fructosa la realizan los vinos dulces y los extractos hidroalcohólicos de uvas pasas y ciruelas pasas. Las cantidades de glucosa en los extractos de uvas pasas, así como las de ambos azúcares en los vinos dulces fueron todas superiores a 1 g/L. La adición de estos dos extractos y del vino dulce podría justificar el aumento en las concentraciones de glucosa y fructosa observado en *Brandies de Jerez* comerciales en relación a los procedentes del ensayo experimental de envejecimiento. Estas elevadas cantidades de glucosa y fructosa están acompañadas en los extractos de ciruelas por una pequeña cantidad de sorbitol. El sorbitol no se encontró en los *Brandies de Jerez* comerciales, por lo que se concluye que no se les ha adicionado extracto de ciruelas o que dicha adición se ha realizado a dosis menores a las utilizadas como referencia. Los extractos de nueces y vainilla contienen cantidades más moderadas de glucosa y fructosa, parecidas a las encontradas en los brandies del ensayo de envejecimiento. Los extractos de robles no tostados aportan cantidades muy pequeñas de arabinosa, xilosa, glucosa y fructosa que en cierto modo *respetan* el perfil de azúcares procedente del envejecimiento en bota, ya que son inferiores a las encontradas en el ensayo de envejecimiento.

Los extractos de almendras también aportan concentraciones que están por debajo de las encontradas en los brandies del ensayo experimental. No obstante, hay que tener en cuenta que las conclusiones relativas a las dosis empleadas son en general comprometidas, ya que estas proporciones pueden variar considerablemente entre distintas bodegas. Asimismo, existe la posibilidad de que estas sustancias sean elaboradas siguiendo criterios particulares de la bodega (siempre de acuerdo a la

reglamentación específica sobre agentes aromatizantes). Todo ello complica la extracción de conclusiones finales sobre la influencia de esta práctica tradicional en la composición en azúcares del *Brandy de Jerez*.

Para evitar el problema de la variabilidad en las dosis, se ha recurrido a las proporciones entre azúcares. En la *tabla 21* se muestra la relación glucosa/fructosa en los extractos y caramelos estudiados, así como los rangos encontrados en los *Brandies de Jerez* comerciales y procedentes del ensayo experimental de envejecimiento. Como se observa en la tabla, esta proporción es más elevada en los brandies del sistema de envejecimiento con respecto a los comerciales, lo que revela una disminución relativa de glucosa o un aumento relativo de fructosa en estos últimos. En el caramelo de sacarosa y de glucosa esta proporción es mayor de 4, valor muy superior al encontrado en ambos tipos de brandies, así como en el resto de extractos y caramelos. Por tanto, se podría concluir que los caramelos de sacarosa y de glucosa no se utilizan en la elaboración del *Brandy de Jerez*. En el resto de extractos y caramelos existe una gran variabilidad, desde una relación de 1 (igual cantidad de ambos azúcares) en los vinos dulces hasta una proporción superior a 2 (doble cantidad de glucosa) en los extractos de almendras y vainilla, sin olvidar que no se encontró fructosa en el caramelo de mosto 3. En los extractos de roble A y C, el caramelo de mosto 1 y las maceraciones de ciruelas, almendras y vainilla, la relación glucosa/fructosa está dentro del rango del sistema experimental de envejecimiento, mientras que el caramelo de mosto 2, las maceraciones de pasas y nueces y los vinos dulces tienen valores por debajo del límite inferior de este rango, por lo que podrían contribuir a la disminución que se observa en esta proporción al pasar de brandies del ensayo de envejecimiento a *Brandies de Jerez* comerciales. Teniendo en cuenta las cantidades totales, sólo las maceraciones de pasas y los vinos dulces podrían justificar el aumento en las concentraciones de glucosa y fructosa al pasar de brandies del ensayo experimental de envejecimiento a *Brandies de Jerez* comerciales, ya que el caramelo de mosto 2 y los extractos de nueces aportan cantidades muy pequeñas de estos compuestos.

	Arabinosa	Galactosa	Xilosa	Manosa	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Sorbitol
Brandy S (SE)	5,65 mg/L	1,86 mg/L	3,00 mg/L	0	8,43 mg/L	4,54 mg/L	0	0
Brandy SR (SE)	8,45 mg/L	2,57 mg/L	3,75 mg/L	0	11,66 mg/L	5,71 mg/L	0	0
Brandy SGR (SE)	12,02 mg/L	3,50 mg/L	5,01 mg/L	0	15,63 mg/L	8,31 mg/L	0	0
Brandy S (COM)	-	-	-	-	5,97 g/L	5,21 g/L	1,09 g/L	0
Brandy SR (COM)	-	-	-	-	7,07 g/L	5,97 g/L	0,30 g/L	0
Brandy SGR (COM)	-	-	-	-	7,22 g/L	5,90 g/L	0,22 g/L	0
Caramelo sacarosa	0	0	0	1,10 mg/L	52,58 mg/L	12,30 mg/L	0	0
Caramelo glucosa	0	0	0	3,68 mg/L	30,52 mg/L	7,49 mg/L	0	0
Caramelo mosto 1	0	0	0	1,09 mg/L	26,04 mg/L	13,80 mg/L	0	0
Caramelo mosto 2	0	0	0	1,76 mg/L	53,65 mg/L	50,63 mg/L	0	0
Caramelo mosto 3	0	0	0	1,26 mg/L	37,66 mg/L	0	0	0
Roble A (3ml/L)	0,51 mg/L	0	0,42 mg/L	0	1,46 mg/L	0,88 mg/L	0	0
Roble C (3ml/L)	0,89 mg/L	0	0,54 mg/L	0	3,88 mg/L	2,54 mg/L	0	0
Roble T (3ml/L)	0	0	0	0	0	0	0	0
Ciruelas (8ml/L)	0	0	0	0	481,99 mg/L	261,58 mg/L	0	0,65 g/L
Pasas (8ml/L)	0	0	0	0	1272,88 mg/L	997,31 mg/L	0	0
Almendras (4ml/L)	0	0	0	0	1,12 mg L ⁻¹	0,50 mg L ⁻¹	0	0
Nueces (8ml/L)	0	0	0	0	15,49 mg L ⁻¹	13,62 mg L ⁻¹	0	0
Vainilla (1ml/L)	0	0	0	0	10,66 mg L ⁻¹	5,01 mg L ⁻¹	0	0
Vino dulce (8ml/L)	0	0	0	0	1,31 g/L	1,31 g/L	0	0

Tabla 20: Aportación al brandy de los diferentes extractos hidroalcohólicos y caramelos empleados en su elaboración.

	Relación glucosa/fructosa
Brandy solera piloto	1,33-2,59
<i>Brandy de Jerez</i> comercial	1,02-1,65
Caramelo sacarosa (0,3 g/L)	4,27
Caramelo glucosa (0,3 g/L)	4,07
Caramelo mosto 1 (0,3 g/L)	1,89
Caramelo mosto 2 (0,3 g/L)	1,06
Caramelo mosto 3 (0,3 g/L)	-
Extracto roble A (3mL/L)	1,66
Extracto roble C (3mL/L)	1,53
Extracto ciruelas (8mL/L)	1,84
Extracto pasas (8mL/L)	1,28
Extracto almendras (4mL/L)	2,24
Extracto nueces (8mL/L)	1,14
Extracto vainilla (1mL/L)	2,13
Vinos dulces (8mL/L)	1,00

Tabla 21: Relación glucosa/fructosa en los extractos y caramelos estudiados. Comparación con el Brandy de Jerez.

5. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES MEDIANTE GC-MS

En este apartado, se ha analizado el perfil aromático de los brandies, con la finalidad de estudiar la relación entre el contenido en compuestos volátiles del brandy y su tiempo de envejecimiento. La metodología analítica utilizada fue la cromatografía de gases con detección mediante espectrometría de masas. Se utilizó inyección directa dada la importancia de la posible aplicabilidad de este método al análisis de rutina. Por este motivo, se analizaron sobre todo componentes mayoritarios del brandy.

5.1. IDENTIFICACIÓN DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN BRANDY

En la *tabla 22* se detallan los compuestos volátiles que fueron identificados en *Brandies de Jerez* comerciales, brandies del ensayo experimental de envejecimiento y aguardientes que aún no habían entrado en el sistema de envejecimiento, es decir, que no habían tenido contacto con las botas. Las *figuras 37 y 38* muestran los cromatogramas de un brandy comercial y otro del sistema de envejecimiento experimental. Las identificaciones de los picos cromatográficos se realizaron por contraste con los espectros de masas de la librería y fueron confirmadas con los tiempos de retención de los patrones (con excepción del 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona y el hidrógeno succinato de etilo, que se comentan más adelante). El criterio para seleccionar los compuestos susceptibles de estar presentes en los brandies consistió en aquellos compuestos propuestos por la librería *NIST 98 MS* para los espectros de masas de los picos cromatográficos, compuestos volátiles descritos en la bibliografía para destilados (ver capítulo 3. *Parámetros de calidad en destilados envejecidos en madera*, de los *antecedentes*) y compuestos volátiles de interés analizados en bodegas de brandy de la zona.

Sistema de envejecimiento	Brandies de Jerez comerciales	Aguardientes
1-Propanol	1-Propanol	1-Propanol
Isobutanol	Isobutanol	Isobutanol
1-Butanol	1-Butanol	1-Butanol
Hexanoato de etilo	-	Hexanoato de etilo
Alcoholes isoamílicos	Alcoholes isoamílicos	Alcoholes isoamílicos
1-Hexanol	1-Hexanol	1-Hexanol
Octanoato de etilo	-	Octanoato de etilo
Furfural (2-furaldehído)	Furfural (2-furaldehído)	-
Ácido acético	Ácido acético	-
Succinato de dietilo	Succinato de dietilo	-
Fenil etil alcohol	Fenil etil alcohol	Fenil etil alcohol
Ácido octanoico	-	-
-	DDMP	-
-	Glicerina	-
-	Tartrato de dietilo	-
-	Hidrógeno succinato de etilo	-
-	5-Hidroximetilfurfural	-

Tabla 22: Compuestos volátiles identificados en Brandies de Jerez comerciales, brandies del ensayo experimental de envejecimiento y aguardientes antes de entrar al sistema de envejecimiento (GC-MS). DDMP: 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4H-piran-4-ona.

La 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-4(H)-piran-4-ona (en adelante, DDMP) y el hidrógeno succinato de etilo fueron identificados en *Brandies de Jerez* comerciales únicamente a partir del espectro de masas, ya que no se encontraron patrones comerciales de estos compuestos en el mercado. Por este motivo, se utilizarán sus áreas relativas en los tratamientos estadísticos posteriores. El succinato de dietilo y su éster monoetilo (hidrógeno succinato de etilo) han sido descritos en uvas, vino y destilados^{21,22}. En el presente trabajo, el succinato de dietilo fue identificado en los *Brandies de Jerez* comerciales y del sistema de envejecimiento, mientras que, su éster monoetilo sólo se encontró en *Brandies de Jerez* comerciales. Ninguno de los dos compuestos se encontró en los aguardientes que no habían tomado contacto con las botas. Estas observaciones coinciden con las afirmaciones de varios autores, que defienden que la principal fuente de succinato de dietilo es el envejecimiento, ya sea a

partir de la propia madera^{23,24} (por reacción entre el alcohol etílico y el ácido succínico de la madera), o bien del envinado de las botas^{25,26}.

El DDMP fue identificado en extractos de roble tostado por primera vez por Cutzach, I. et al.²⁷. Este compuesto contribuye activamente al aroma a *caramelo tostado* de la madera sometida a un proceso de tostado. Se encuentra en muchos alimentos cocinados²⁸ y es el resultado de la descomposición de ciertos compuestos formados en las reacciones de Maillard²⁹. La degradación térmica del DDMP da lugar a la formación de un gran número de compuestos, como el 3-hidroxibutan-2-ona, el ácido acético y el furfural³⁰. El DDMP sólo se encontró en los *Brandies de Jerez* comerciales, por lo que podría proceder del colorante caramelo y/o de los extractos de roble adicionados con posterioridad al envejecimiento.

El 2-furancarboxaldehído (denominado comúnmente como furfural) y el ácido acético fueron identificados en los *Brandies de Jerez* comerciales y del sistema de envejecimiento, sin embargo se decidió no cuantificarlos ya que solapaban en muchas ocasiones, además de que estos compuestos ya habían sido previamente determinados en las mismas muestras por otros miembros del proyecto de investigación* en el que se encuadra la presente Tesis Doctoral (el furfural se determinó mediante cromatografía de reparto en fase inversa con detector de absorbancia con sistema de fotodiodos alineados³¹, y el ácido acético mediante cromatografía de exclusión iónica y detección conductimétrica³²). Por este motivo, no se consideró necesario modificar el método para evitar el solapamiento entre estos compuestos.

El furfural ha sido relacionado en la bibliografía con el envejecimiento en madera^{23,24,33}, aunque algunos autores justifican su presencia en destilados sin envejecer como originada por el calentamiento prolongado durante la destilación^{23,24,34}. En los brandies objeto de estudio, el furfural estuvo presente en *Brandies de Jerez* comerciales y procedentes del ensayo de envejecimiento, pero no se encontró en los aguardiente analizados, lo que confirmaría que, en este caso, procede únicamente del envejecimiento en madera. El 5-hidroximetilfurfural, sin embargo, procede en su mayoría de la adición de color caramelo³⁵, lo que justifica su ausencia en los brandies del ensayo experimental de envejecimiento. Otros compuestos que únicamente fueron identificados en los *Brandies de Jerez* comerciales analizados en este trabajo fueron la glicerina y el tartrato de dietilo, mientras que el ácido octanoico, el octanoato de etilo y el hexanoato de etilo sólo se encontraron en brandies del ensayo experimental de envejecimiento. El octanoato de etilo y el hexanoato de etilo también se encontraron en los aguardientes no envejecidos.

* “Optimización de los procesos de elaboración con vistas a la obtención de un Brandy de Jerez de calidad”. Plan Nacional I+D, ref. AGL2001-3737.

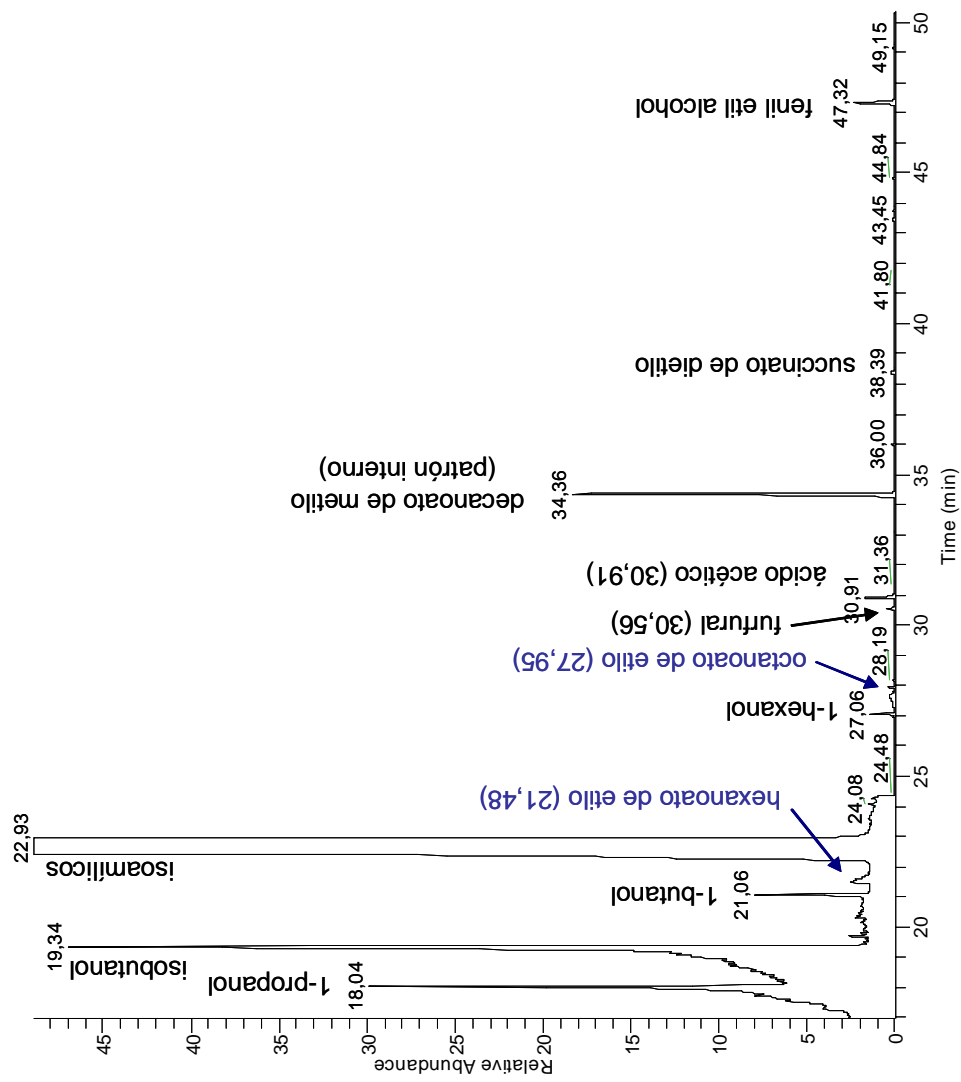
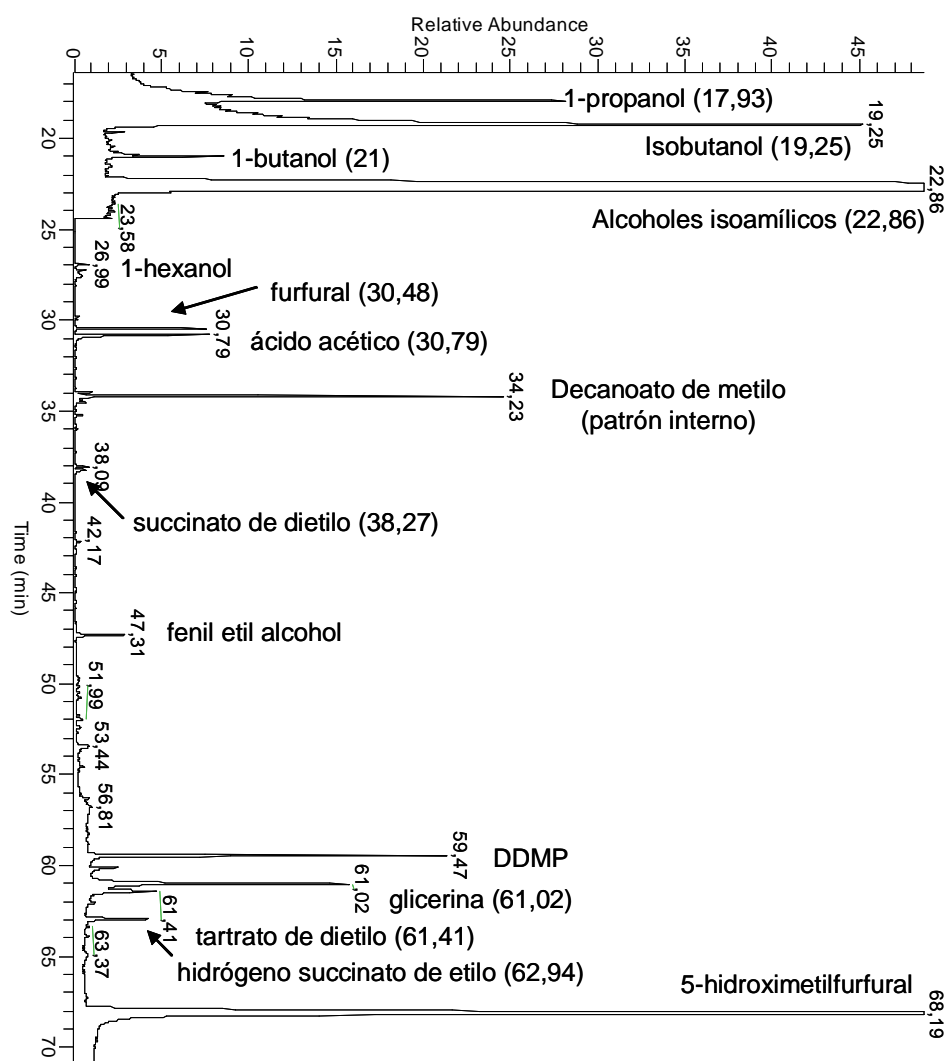


Figura 37: Perfil aromático de un brandy del ensayo experimental de envejecimiento (GC-MS).

Figura 38: Perfil aromático de un brandy comercial (GC-MS).



5.2. REPETIBILIDAD

Al igual que se hizo anteriormente, la repetibilidad del método fue medida para el tiempo de retención y la respuesta del mismo. Los resultados, que se muestran en la *tabla 23*, fueron expresados como coeficiente de variación (CV) tanto de los tiempos de retención como de las señales cromatográficas (en unidades de área relativa). Como se observa en la tabla, la repetibilidad, aunque aceptable en ambos casos, fue mejor para los tiempos de retención que para las áreas relativas de los picos cromatográficos. La repetibilidad en relación al tiempo de retención fue, en todos los casos, menor al 3 %, mientras que en relación a las áreas relativas fue siempre inferior al 27,4 %.

Compuesto	CV % (área relativa)	CV % (tiempo retención)
1-Propanol	5,5	1,2
Isobutanol	3,0	1,6
1-Butanol	12,8	1,8
Hexanoato de etilo	9,4	2,6
Alcoholes isoamílicos	6,3	1,9
1-Hexanol	11,4	2,2
Octanoato de etilo	20,6	3,0
Furfural (2-furaldehído)	21,0	1,7
Ácido acético	17,4	1,3
Succinato de dietilo	22,3	2,1
Fenil etil alcohol	8,8	1,8
Ácido octanoico	14,3	1,6
Compuesto a	5,9	1,7
5-Hidroximetilfurfural	27,4	2,3

Tabla 23: Repetibilidad en la determinación de compuestos volátiles en brandy mediante GC-MS.

5.3. CARACTERIZACIÓN DE LA SEPARACIÓN

La separación cromatográfica fue evaluada para los compuestos estudiados mediante el factor de capacidad (K'), el factor de separación (selectividad, α) y la resolución (R). Los resultados se presentan en la *tabla 24*, donde puede verse que el factor de separación es siempre mayor que 1, mientras que la resolución es siempre superior a 3,3. El factor de separación y la resolución han sido calculadas entre cada compuesto y el siguiente en la tabla, con excepción del DDMP, cuyo factor de separación ha sido calculado con respecto al fenil etil alcohol, ya que el ácido octanoico no se encuentra en los *Brandies de Jerez* comerciales. A su vez, la resolución del DDMP fue calculada con respecto a la glicerina, ya que ambos se encuentran únicamente en *Brandies de Jerez* comerciales.

Compuesto	Concentración (mg/L)	K'	α	R
1-Propanol	57,70	4,49	-	-
Isobutanol	34,25	4,88	1,09	13,47
1-Butanol	2,24	5,39	1,11	18,89
Hexanoato de etilo	0,49	5,54	1,03	3,33
Alcoholes isoamílicos	257,01	5,94	1,07	3,59
1-Hexanol	5,73	7,19	1,21	15,30
Octanoato de etilo	4,60	7,46	1,04	18,00
Furfural (2-furaldehído)	17,59	8,24	1,10	51,80
Ácido acético	101,61	8,34	1,01	5,17
Succinato de dietilo	74,58	10,58	1,27	64,70
Fenil etil alcohol	12,94	13,31	1,26	72,08
Ácido octanoico	11,76	14,84	1,12	53,37
DDMP	1,84	16,97	1,28	-
Glicerina	639,58	17,43	1,03	15,10
Tartrato de dietilo	8,94	17,56	1,01	4,00
Hidróg.-succinato etilo	0,41	18,04	1,03	14,86
5-Hidroximetilfurfural	1774,37	19,57	1,09	32,84

Tabla 24: Factor de capacidad, factor de separación y resolución para los compuestos volátiles estudiados.

5.4. ESTANDARIZACIÓN DE LA SEÑAL (CALIBRACIÓN)

La calibración se realizó mediante el análisis por triplicado de diferentes mezclas de patrones de distintas concentraciones. En todos los casos, el intervalo lineal de concentraciones obtenido incluye al rango de concentraciones encontradas en los brandies estudiados. Las curvas de calibrado obtenidas, así como los parámetros analíticos característicos de las mismas vienen reflejados en la *tabla 25*.

Compuesto	LD (mg/L)	Curva de calibrado ($Y = a + bX$)		SD _a	SD _b	R ²
		Pendiente (b)	O. origen (a)			
1-Propanol	34,35	0,031	-0,289	0,175	0,001	0,981
Isobutanol	74,388	0,608	-15,983	8,197	0,029	0,965
1-Butanol	1,141	0,787	-1,479	0,213	0,023	0,991
Hexanoato etilo	1,398	0,165	0,028	0,044	0,005	0,992
Alc. isoamílicos	1990,505	0,070	7,658	20,168	0,005	0,943
1-Hexanol	12,401	0,009	-0,003	0,013	0,0003	0,980
Octanoato etilo	18,482	0,035	-0,149	0,135	0,002	0,968
Furfural	91,694	0,023	-0,388	0,312	0,001	0,952
Ácido acético	694,931	0,004	-0,293	0,367	0,0002	0,967
Succinato dietilo	1,661	0,281	-20,912	1,681	0,021	0,947
Fenil etil alcohol	7,441	0,015	-0,019	0,017	0,0003	0,992
Glicerina	196,951	0,030	-18,370	3,242	0,003	0,964
Tartrato dietilo	5,390	12,194	-107,907	15,556	0,727	0,966
5-HMF	556,515	0,067	-98,400	14,118	0,005	0,966
Ácido octanoico	7,437	0,006	-0,018	0,007	0,0003	0,966

Tabla 25: Calibración externa de los compuestos volátiles y parámetros relacionados.

5.5. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN BRANDIES DEL ENSAYO EXPERIMENTAL DE ENVEJECIMIENTO

Una vez validado el método cromatográfico, se procedió a la determinación de los compuestos volátiles identificados en los brandies del ensayo experimental de envejecimiento. En la *tabla 26* se muestran las concentraciones medias, mínimas y máximas, así como las desviaciones estándar correspondientes a las categorías de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva para cada uno de los compuestos medidos. Como se observa en esta tabla, la evolución de los compuestos volátiles no sigue un patrón tan regular como ocurría con los azúcares, lo que se explicaría en parte teniendo en cuenta la propia naturaleza de los compuestos analizados, más susceptibles de evaporación, por lo que en este caso el balance extracción/dilución adquiere mayor complejidad. Además, es preciso tener en cuenta que, a diferencia de los azúcares, los aguardientes no envejecidos que se analizaron ya contenían muchos de estos compuestos volátiles, lo que afectará en gran medida a la composición volátil del destilado durante el envejecimiento. Por tanto, las diferencias en la composición volátil de los aguardientes que se van incorporando al sistema por la tercera escala, aumentarían la variabilidad observada en las concentraciones.

	Tipo	Media (mg/L)	Mínimo (mg/L)	Máximo (mg/L)	C.V.
1-Propanol	S	76,28	58,27	95,12	13,84
	SR	81,42	43,53	222,20	50,99
	SGR	100,18	49,38	150,22	46,15
Isobutanol	S	58,46	38,94	81,26	22,80
	SR	49,46	35,92	82,75	33,39
	SGR	54,42	36,07	79,29	38,98
1-Butanol	S	2,64	2,18	3,00	10,42
	SR	2,45	2,12	3,84	17,88
	SGR	2,45	2,13	2,88	15,74
Hexanoato etilo	S	1,41	0,17	2,23	50,08
	SR	1,13	0,29	2,99	68,66
	SGR	1,18	0,47	2,24	78,86
Alc. isoamílicos	S	760,44	286,64	1148,50	36,42
	SR	514,55	223,67	1383,51	66,85
	SGR	524,23	214,74	948,95	73,09
1-Hexanol	S	12,01	8,42	15,71	18,04
	SR	10,85	8,07	23,99	32,98
	SGR	11,34	8,90	15,22	25,96
Octanoato etilo	S	487,02	485,79	488,20	0,16
	SR	486,38	485,57	487,74	0,16
	SGR	486,50	485,77	487,34	0,15
Succinato dietilo	S	77,33	77,30	77,36	0,02
	SR	77,35	77,31	77,39	0,02
	SGR	77,36	77,34	77,39	0,03
2-Feniletanol	S	16,14	13,23	19,59	14,96
	SR	16,47	13,04	23,09	17,04
	SGR	17,40	15,22	18,90	8,93
Ácido octanoico	S	12,13	9,00	15,13	15,53
	SR	12,35	10,09	14,75	10,74
	SGR	12,69	11,84	13,57	6,02

Tabla 26: Concentraciones de compuestos volátiles en los brandies del ensayo experimental de envejecimiento (GC-MS).

Con el objetivo de verificar si, al igual que ocurría con los azúcares, la diferenciación entre escalas se hacía más acusada al aumentar el número de saca, se recurrió al análisis lineal discriminante. Efectivamente, se comprobó que la diferenciación es mayor al aumentar el número de saca, ya que el porcentaje de clasificación entre escalas va aumentando a medida que se van eliminando de la clasificación las muestras correspondientes a las primeras sacas (*tabla 27*). El 100 % de clasificación entre escalas se consiguió utilizando las muestras a partir de la saca 11, que correspondería a un tiempo de 2 años y 9 meses. La matriz de clasificación obtenida para las sacas 11-19 se muestran en la *tabla 28*. En el modelo se incluyeron todas las variables con excepción del ácido octanoico y el octanoato de etilo. La variable con mayor poder de discriminación fue el 2-feniletanol, seguido del succinato de dietilo, hexanoato de etilo y 1-hexanol. El gráfico de las muestras sobre el plano de las variables canónicas (*figura 41*) refleja la diferenciación entre las cuatro escalas.

Número de saca de las muestras incluidas	Porcentaje correcto de clasificación global
1-19	60,87
2-19	69,05
3-19	65,00
4-19	73,68
5-19	68,57
6-19	59,38
7-19	86,21
8-19	92,86
9-19	92,59
10-19	95,65
11-19	100,00

Tabla 27: LDA para la clasificación entre escalas.

Escala de envejecimiento	Porcentaje correcto	P	G	T	S
P	100,00	4	0	0	0
G	100,00	0	5	0	0
T	100,00	0	0	4	0
S	100,00	0	0	0	6
Total	100,00	4	5	4	6

Tabla 28: Matriz de clasificación para la diferenciación entre escalas desde la saca 11 (S: Solera, P: Primera Criadera, G: Segunda Criadera, T: Tercera Criadera).

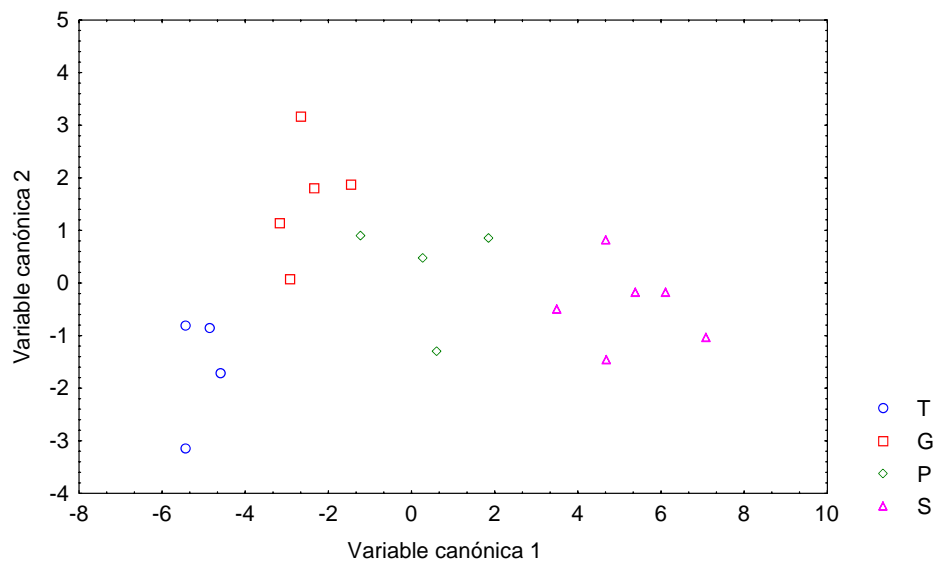


Figura 41: Análisis canónico de la diferenciación por escalas (S: Solera, P: Primera Criadera, G: Segunda Criadera, T: Tercera Criadera).

5.6. CLASIFICACIÓN DE LOS BRANDIES DEL ENSAYO DE ENVEJECIMIENTO

Se ha ensayado mediante Análisis Lineal Discriminante la capacidad de las concentraciones de compuestos volátiles para clasificar los brandies del ensayo de envejecimiento según la denominación comercial de Solera (S, más de 6 meses de envejecimiento), Solera Reserva (SR, más de un año) y Solera Gran Reserva (SGR, más de 3 años). Con ello se intenta verificar si, a pesar de que la evolución del perfil aromático no es tan clara como la de los azúcares, las variaciones observadas en las concentraciones de compuestos volátiles están relacionadas con el tiempo de envejecimiento. La matriz de clasificación obtenida se muestra en la *tabla 29*.

	Porcentaje correcto	S	SR	SGR
S	91,67	11	1	0
SR	85,71	1	18	2
SGR	40,00	0	3	2
Total	81,58	12	22	4

Tabla 29: Matriz de clasificación para la diferenciación entre categorías comerciales (S: Solera; SR: Solera Reserva, SGR: Solera Gran Reserva).

Como se observa en la *tabla 29* el modelo fue capaz de clasificar correctamente el 91,7 % de los brandies Solera, el 85,7 % de los Solera Reserva y el 40 % de los Solera Gran Reserva. Globalmente, el 81,6 % de las muestras fueron correctamente clasificadas. Estos elevados porcentajes confirman que las variaciones observadas en los contenidos de compuestos volátiles están, por tanto, relacionados con el tiempo de envejecimiento. Los porcentajes de clasificación son parecidos a los obtenidos utilizando las concentraciones de azúcares. Para ambas familias de compuestos, el porcentaje más bajo de clasificación corresponde al grupo Solera Gran Reserva, lo que puede deberse en parte al pequeño número de muestras disponibles.

Las variables incluidas en el modelo fueron succinato de dietilo, alcohol isoamílico, hexanoato de etilo, isobutanol y ácido octanoico. De entre estas variables, el alcohol isoamílico y el succinato de dietilo fueron los que mostraron mayor poder de discriminación. Si se compara este modelo con el obtenido para la diferenciación entre

escalas, succinato de dietilo, hexanoato de etilo, alcohol isoamílico e isobutanol están presentes en ambos modelos, por tanto, los contenidos en estos cuatro compuestos (dos alcoholes superiores y dos ésteres) parecen verse afectados en gran medida por la etapa de envejecimiento. En el caso del succinato de dietilo, su relación con el envejecimiento (ya sea por la propia madera o por el envinado) es confirmada por la bibliografía^{23,24,25,26}. El gráfico de las muestras sobre el plano de las variables canónicas (figura 29) refleja la diferenciación entre los tres tipos comerciales (Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva).

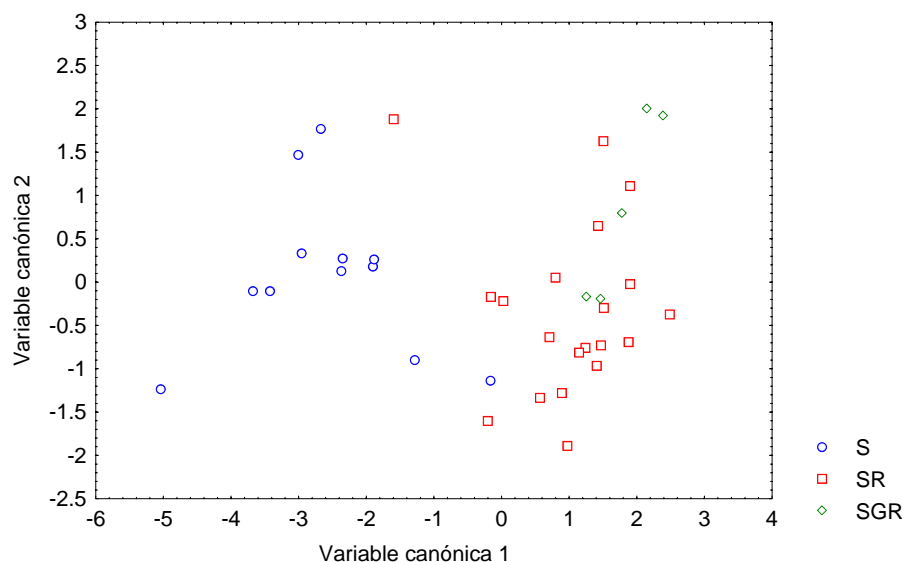


Figura 39: Análisis canónico de la diferenciación por categorías para los brandies del ensayo de envejecimiento (Solera \circ ; Solera Reserva \square ; Solera Gran Reserva \triangle).

5.7. PREDICCIÓN DEL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO

Los porcentajes de clasificación obtenidos en los brandies del sistema de envejecimiento revelan que existe una relación entre el contenido en compuestos volátiles de estos brandies y el tiempo de envejecimiento. Por ello, la siguiente etapa de

este trabajo fue la predicción del tiempo medio de envejecimiento de los brandies del sistema experimental a partir de las concentraciones de los compuestos volátiles determinados. Para ello se utilizará la regresión de mínimos cuadrados parciales.

En la *tabla 30* se muestran los parámetros característicos del modelo obtenido con mínimos cuadrados parciales. Como se observa en la tabla, los resultados revelan un ajuste deficiente, con bajos coeficientes de correlación y elevados errores cuadráticos medios.

	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación	Error cuadrático medio
Calibración	0,60	0,63	0,77	0,56
Validación	0,54	0,70	0,68	0,66

Tabla 30: Parámetros de la regresión por mínimos cuadrados parciales ensayada para la predicción del tiempo medio de envejecimiento (años) a partir de las concentraciones de los compuestos volátiles.

En vista de que la relación entre el tiempo de envejecimiento y el contenido en compuestos volátiles no es adecuadamente modelada mediante la regresión de mínimos cuadrados parciales, se recurrió a las redes neuronales artificiales, como técnica estadística más novedosa y potente que las técnicas clásicas de regresión. De esta forma, las concentraciones de cada uno de los compuestos volátiles serán las neuronas de entrada a la red neuronal.

Para la predicción del tiempo medio de envejecimiento, fue necesario optimizar la topología de la red en función del número de neuronas de la capa oculta. Una vez fijado este parámetro, se procedió a afinar el modelo mediante la optimización de la velocidad de aprendizaje. Para la optimización, se ha fijado en 100000 el número máximo de ciclos utilizados para el entrenamiento (un ciclo equivale a un barrido completo del conjunto de entrenamiento a través de la red) y en 100 el número de ciclos sin mejora para detener la iteración. Durante el entrenamiento de la red, se ha utilizado el método de validación cruzada. Como los pesos iniciales fueron generados de manera aleatoria, se realizaron tres procedimientos de entrenamiento diferentes cada vez, es decir, se generaron tres modelos para cada topología de red, promediando al final los valores de RMSEP (error cuadrático medio de predicción).

Durante la optimización del número de neuronas de la capa oculta, se ha fijado una velocidad de aprendizaje intermedia de 0,7 (recomendada por el programa). Como la capa de entrada tiene 10 neuronas y la de salida 1 (el valor del tiempo medio de envejecimiento), la optimización se realizará entre 2 (el software no permite usar una única neurona en la capa oculta) y 12 neuronas (*tabla 31*). El hecho de utilizar un modelo con pocas neuronas en la capa oculta mejora la capacidad predictiva del mismo, existiendo mayores garantías de que no se produzcan fenómenos de sobreajuste. Estos fenómenos se deben principalmente al empleo de una gran cantidad de nodos ocultos, lo que aumenta en gran medida el número de parámetros del modelo neuronal (conexiones entre neuronas que llevan asociadas un determinado peso) que deben ser establecidos durante el proceso de entrenamiento. A partir de los datos de la mitad superior de la tabla, correspondientes a la optimización del número de neuronas de la capa oculta, se decidió que el número óptimo de neuronas era de dos, ya que, aunque con 4 y 6 neuronas se consiguen unos RMSEP ligeramente menores, se consideró que no compensaba la leve disminución en el error cuadrático medio con el aumento en la complejidad del modelo que conlleva el uso de 2 ó 4 neuronas más en la capa oculta. Por tanto, se estableció que el número óptimo de neuronas sería de 2, que se corresponde con un RMSEP de validación cruzada de 0,1684 años.

Posteriormente, se procedió a optimizar la velocidad de aprendizaje con una red de 2 neuronas en la capa oculta. Este parámetro controla la rapidez a la que el algoritmo de entrenamiento desarrolla su aprendizaje. Un valor pequeño posibilita que la convergencia de los pesos hasta un valor óptimo sea lenta, existiendo no obstante el peligro de encontrar un mínimo local. Por el contrario, si el valor de la velocidad de aprendizaje es alto, el sistema puede oscilar (inestabilidad) y provocar divergencia en el entrenamiento. El valor apropiado de la velocidad de aprendizaje depende muchas veces de la función de transferencia empleada en las neuronas: para funciones sigmoidales, como es nuestro caso, se emplean valores entre 0,5 y 1. En este caso, el valor más bajo de RMSEP de validación cruzada (0,1613 años) correspondió a una velocidad de aprendizaje de 1, que se consideró la velocidad óptima. De esta forma, la red neuronal artificial de una mayor capacidad predictiva fue la formada por 2 neuronas en la capa oculta con una velocidad de aprendizaje de 1 (topología 10-2-1).

Neuronas capa oculta	Velocidad aprendizaje	RMSEP validación cruzada
2	0,7	0,1684
3	0,7	0,1686
4	0,7	0,1675
5	0,7	0,1733
6	0,7	0,1680
7	0,7	0,1713
8	0,7	0,1689
9	0,7	0,1745
10	0,7	0,1711
11	0,7	0,1742
12	0,7	0,1736
2	0,5	0,1798
2	0,6	0,1724
2	0,7	0,1684
2	0,8	0,1644
2	0,9	0,1641
2	1	0,1613

Tabla 31: Optimización de la topología de una red neuronal artificial para la predicción del tiempo medio de envejecimiento (topología óptima en negrita).

Como conclusión general de este apartado de predicción del tiempo medio de envejecimiento, puede decirse que la diferenciación por categorías comerciales (Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva) reveló una relación entre los contenidos en compuestos volátiles de los brandies del ensayo experimental y el tiempo medio de envejecimiento. Esta relación, aunque no puede modelarse mediante una regresión clásica, sí se pone de manifiesto mediante técnicas estadísticas más complejas y potentes como las redes neuronales artificiales, como lo demuestran los bajos valores de error cuadrático medio de predicción obtenidos (0,161 años, unos 2 meses aproximadamente).

5.8. ANÁLISIS DE COMPUESTOS VOLÁTILES EN *BRANDIES DE JEREZ* COMERCIALES

Una vez caracterizado el perfil aromático en el ensayo de envejecimiento, se procedió a medir las cantidades de compuestos volátiles encontradas en los *Brandies de Jerez* comerciales. En la *tabla 32* se muestran las concentraciones medias, mínimas y máximas, así como las desviaciones estándar correspondientes a las categorías de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva para cada uno de los compuestos medidos. Los datos relativos al DDMP y al hidrógeno succinato de etilo aparecen expresados como áreas relativas, ya que, según se comentó anteriormente, no existen patrones comerciales de estos compuestos. Al igual que ocurría con las brandies del ensayo experimental de envejecimiento, no se observa una progresión al pasar de los Solera a los Solera Reserva o a los Solera Gran Reserva, no obstante es preciso tener en cuenta que estos brandies han sufrido adiciones de extractos aromáticos y colorante caramelo, que podrían modificar su perfil aromático, que ya no procedería en su totalidad del envejecimiento. Por este motivo, y para verificar si, a pesar de todo, era posible clasificar los *Brandies de Jerez* comerciales en base a su contenido en sustancias volátiles, se realizará un análisis clasificatorio de los mismos.

	Tipo	Media (mg/L)	Mínimo (mg/L)	Máximo (mg/L)	C.V.
1-Propanol	S	94,21	57,58	194,92	43,74
	SR	67,25	52,72	90,27	20,11
	SGR	69,37	42,87	149,59	34,30
Isobutanol	S	49,17	31,88	162,20	65,95
	SR	35,75	32,78	39,87	6,76
	SGR	43,16	31,93	125,63	50,78
1-Butanol	S	2,29	1,96	3,78	19,48
	SR	2,15	1,96	2,29	5,40
	SGR	2,42	2,03	4,60	23,20
Isoamílicos	S	417,25	64,61	1211,53	91,44
	SR	183,87	67,44	379,79	61,42
	SGR	229,48	54,82	817,18	78,75
1-Hexanol	S	9,12	6,55	22,17	42,52
	SR	7,51	6,36	9,35	10,82
	SGR	9,42	6,82	30,02	55,42
Succinato dietilo	S	77,41	77,29	77,56	0,14
	SR	77,38	77,30	77,57	0,13
	SGR	77,44	77,31	77,60	0,12
2-Feniletanol	S	12,13	9,10	16,26	19,67
	SR	13,85	9,74	19,75	22,05
	SGR	17,49	11,22	29,03	26,90
DDMP (área)	S	1,74	0,42	4,43	64,24
	SR	2,41	0,33	5,20	65,34
	SGR	2,15	0,59	4,72	52,04
Glicerina	S	728,75	683,15	806,39	6,66
	SR	701,33	683,44	734,46	2,97
	SGR	703,05	680,59	754,55	3,19
Tartrato dietilo	S	8,43	8,40	8,45	0,29
	SR	8,42	8,40	8,49	0,37
	SGR	8,44	8,40	8,48	0,29
Hidróg. succinato etilo (área)	S	0,33	0,18	0,49	46,80
	SR	0,19	0,07	0,41	69,61
	SGR	0,24	0,08	0,44	51,23
5-HMF	S	1795,10	1588,48	2273,92	11,40
	SR	1909,05	1571,00	2352,00	14,90
	SGR	1880,97	1600,86	2137,11	9,05

Tabla 32: Concentraciones de compuestos volátiles en los Brandies de Jerez comerciales (GC-MS).

5.9. CLASIFICACIÓN DE LOS *BRANDIES DE JEREZ* COMERCIALES

Para estudiar si era posible la diferenciación de los *Brandies de Jerez* comerciales a partir del contenido en compuestos volátiles, se recurrió al análisis lineal discriminante. Las variables independientes utilizadas fueron las concentraciones (y áreas en su caso) de todos los compuestos volátiles cuantificados en estos brandies con excepción del succinato de dietilo, glicerina, tartrato de dietilo e hidrógeno succinato de etilo. Estos cuatro compuestos no estaban presentes en todas las muestras analizadas y la sustitución por cero de sus concentraciones alteraría en gran medida el proceso de estandarización que se realiza de forma previa al análisis lineal discriminante. Esto se debe a que, al tipificar, cualquier desviación del valor se transmite como un error que afecta a los resultados de manera multiplicativa, lo que introduciría grandes errores en el modelo.

Los resultados del análisis lineal discriminante se muestran en la *tabla 33* y en la *figura 40*). El modelo pudo clasificar correctamente el 91,67 % de los brandies Solera, el 77,78 % de los brandies Solera Reserva y el 84,35 % de los Solera Gran Reserva. El porcentaje de clasificación obtenido para el grupo Solera Reserva fue menor comparado con los otros dos grupos, lo que podría atribuirse a que, en los *Brandies de Jerez* comerciales, la asignación de las categorías se basa en tiempos mínimos de envejecimiento, por ello existe un solapamiento entre dichas categorías. Esto no ocurrió con los brandies del ensayo de envejecimiento, cuyas categorías fueron asignadas usando como criterio intervalos de tiempo de envejecimiento, lo que justificaría que la clasificación de los Solera Reserva, es mejor en el sistema de envejecimiento experimental.

	Porcentaje correcto	S	SR	SGR
S	91,67	11	1	0
SR	77,78	1	7	1
SGR	82,35	1	2	14
Total	84,21	13	10	15

Tabla 33: Matriz de clasificación para la diferenciación entre categorías comerciales (S: Solera; SR: Solera Reserva, SGR: Solera Gran Reserva).

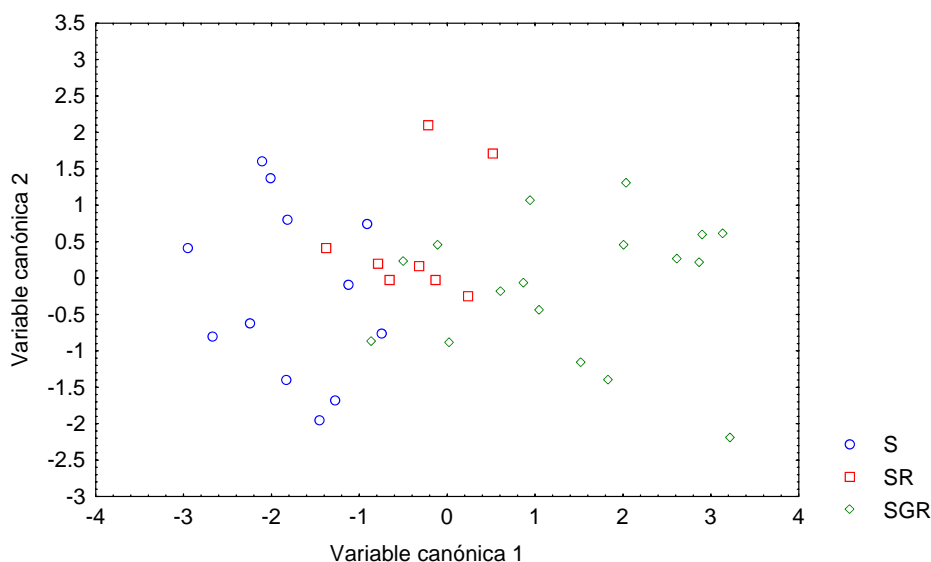


Figura 40: Análisis canónico de la diferenciación por categorías para los Brandies de Jerez comerciales (Solera \circ ; Solera Reserva \square ; Solera Gran Reserva \diamond).

Las variables que fueron incluidas en el modelo fueron 2-feniletanol, isobutanol, 1-butanol, 1-propanol, alcoholes isoamílicos y DDMP. Entre ellas, 2-feniletanol presentó el mayor poder de discriminación, seguido de isobutanol y 1-butanol. El 2-feniletanol también demostró el mayor poder de discriminación para la diferenciación entre las escalas de envejecimiento de los brandies del ensayo experimental, lo que revela la relación de este compuesto con el envejecimiento en ambos tipos de muestras. Por su parte, isobutanol y 1-butanol son alcoholes superiores. Los alcoholes superiores son los más abundantes en los destilados de vino, por tanto se trata de compuestos mayoritarios de fácil cuantificación, lo que facilitaría la aplicación al análisis de rutina.

La diferenciación entre categorías comerciales de los *Brandies de Jerez* también se estudió mediante redes neuronales artificiales. Para la optimización de la red se fijó una velocidad de aprendizaje de 0,7 y un número máximo de 20000 ciclos, con 30 ciclos sin mejora para detener la iteración. Para cada topología, la red se lanzó tres veces y se calcularon los porcentajes medios de clasificación para cada grupo (S, SR y SGR). El número de neuronas de la capa de entrada fue de 8, que corresponden a las concentraciones de los compuestos volátiles para cada una de las muestras analizadas. De esta forma, el número de neuronas ensayado para la capa oculta estuvo entre 2 y 12 neuronas, ya que valores superiores darían lugar a modelos excesivamente complejos. Los resultados de la optimización se muestran en la *tabla 34*. Como se observa en la

parte superior de la tabla, se consideró que el número óptimo de neuronas en la capa oculta era seis. Aunque la red de 7 neuronas presenta un porcentaje ligeramente superior, no se ve compensado por el aumento en la complejidad del modelo y con ello de las posibilidades de sobreajuste. Posteriormente, se procedió a optimizar la velocidad de aprendizaje. Los valores ensayados estuvieron en el rango 0,5-1, considerándose que una velocidad de 0,7 proporcionaba los mejores resultados. En comparación con los resultados obtenidos mediante análisis lineal discriminante, los porcentajes de clasificación obtenidos mediante redes neuronales fueron inferiores, con excepción del grupo Solera Reserva, cuyos porcentajes de clasificación son similares mediante ambas técnicas.

Como resumen de este capítulo, se obtuvieron buenos resultados para la diferenciación de los brandies y para la predicción del tiempo medio de envejecimiento, lo que revela la relación existente entre la composición volátil del brandy y el envejecimiento.

Neuronas capa oculta	Velocidad de aprendizaje	Porcentaje correcto de clasificación			
		S	SR	SGR	Promedio
2	0,7	77,78	77,78	70,59	75,38
3	0,7	80,55	81,48	68,63	76,89
4	0,7	80,55	74,08	68,63	74,42
5	0,7	80,55	70,37	70,59	73,84
6	0,7	80,55	77,78	72,55	76,96
7	0,7	83,33	77,78	70,59	77,23
8	0,7	80,55	74,08	66,67	73,77
9	0,7	77,78	81,48	68,63	75,96
10	0,7	72,22	70,37	70,59	71,06
11	0,7	83,33	74,08	68,63	75,35
12	0,7	80,55	74,08	68,63	74,42
6	0,5	77,78	74,08	72,55	74,80
6	0,6	77,78	77,78	74,51	76,69
6	0,8	80,55	70,37	68,63	73,19
6	0,9	77,78	70,37	66,67	71,61
6	1	75,00	66,67	66,67	69,45

Tabla 34: Optimización de la topología de una red neuronal para clasificar los Brandies de Jerez comerciales según las categorías de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva (topología óptima en negrita).

6. PODER ANTIOXIDANTE

6.1. MEDIDA DEL PODER ANTIOXIDANTE

En este apartado se ha medido el poder antioxidante global de los brandies procedentes del ensayo experimental de envejecimiento (tanto del sistema dinámico de “Soleras y Criaderas” como del estático de “Añadas”), de *Brandies de Jerez* comerciales y de otros destilados de distinta procedencia. También se ha estudiado el poder antioxidante de sustancias adicionadas al brandy después del envejecimiento, como los caramelos y extractos aromáticos, con el objetivo de justificar las diferencias entre los *Brandies de Jerez* comerciales y aquellos procedentes del ensayo de envejecimiento. El objetivo de este capítulo es la caracterización del poder antioxidante en el *Brandy de Jerez*, así como la comparación con otros destilados comerciales.

6.2. ESTANDARIZACIÓN DE LA SEÑAL (CALIBRACIÓN)

La sustancia antioxidante de referencia utilizada para el calibrado fue el ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico o Trolox, según lo descrito por Alonso, A.M. et al.³⁶ en la validación de método. La calibración se realizó a partir del análisis por triplicado de seis disoluciones de Trolox en metanol de concentraciones comprendidas entre 0 y 25 mM. Se tomaron alícuotas de 150 μ L de cada disolución. La función de respuesta utilizada fueron los culombios consumidos en la oxidación del Trolox (Cu_{Trolox}). Los parámetros estadísticos característicos de la curva de calibrado se presentan en la *tabla 35*.

Parámetros estadísticos	Función de respuesta (Cu_{Trolox})
Curva de calibrado ($Y = a + bX$)	$Y=0,096+0,033X$
SD_a	0,002
SD_b	0,022
R^2	0,960
Linealidad	94,9 %
LD	3,904 mM

Tabla 35: Parámetros estadísticos de la recta de calibrado para la medida del poder antioxidante.

6.3. REPETIBILIDAD

Para estudiar la repetibilidad de las medias realizadas, se hicieron repeticiones de una de las muestras de brandy del sistema de envejecimiento (S13) en las mismas condiciones y diferentes días. La repetibilidad obtenida, expresada como coeficiente de variación de la función de respuesta (CuI_{Trolax}), fue del 8,91 %. Este dato se consideró aceptable para el propósito del método y teniendo en cuenta el bajo grado de automatización del mismo.

6.4. PODER ANTIOXIDANTE EN BRANDIES DEL ENSAYO EXPERIMENTAL DE ENVEJECIMIENTO

En la *figura 41* se recoge la evolución del poder antioxidante frente al número de saca en el sistema piloto de Soleras y Criaderas. Los puntos que aparecen en la gráfica son datos experimentales, mientras que las líneas han sido calculadas mediante media móvil utilizando tres periodos.

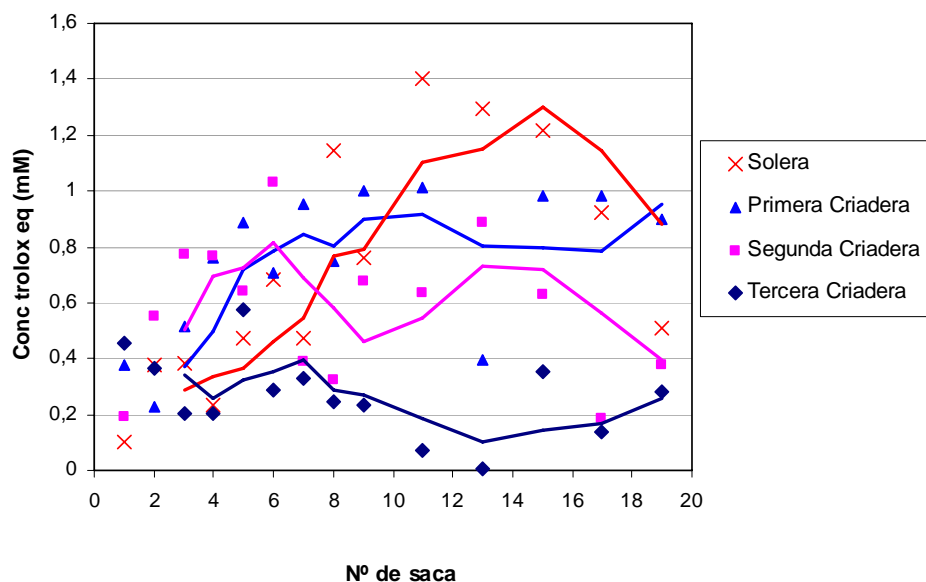


Figura 41: Poder antioxidante en las cuatro escalas del ensayo de envejecimiento.

Como puede observarse en la *figura 41*, en la solera y primera criadera se produce un aumento inicial en el poder antioxidante hasta aproximadamente la saca 11, a partir de la cual hay una estabilización e incluso ligera disminución del mismo. Sin embargo, en la segunda, y sobre todo en la tercera criadera, se observa disminución del poder antioxidante prácticamente desde el inicio de la experiencia, lo que podría deberse a un acusado efecto de dilución respecto del de extracción de los compuestos responsables del poder antioxidante. Esta evolución del poder antioxidante en las escalas del sistema de envejecimiento es similar a la observada para los azúcares. Si se compara el valor del poder antioxidante del brandy que sale de la solera y de un aguardiente que aún no ha entrado en el sistema de envejecimiento (tienen valores de poder antioxidante cercanos a cero), se podría concluir que el envejecimiento en barricas de roble de los aguardientes aumenta su poder antioxidante. Por ello, se plantea como hipótesis que los compuestos responsables del poder antioxidante proceden de las botas.

Al comparar la *figura 41* con la representación gráfica de la vejez media (tiempo medio de envejecimiento) frente al número de Saca para las 4 escalas de envejecimiento (*figura 20*), se observa que, en ambos casos, al aumentar el número de saca, comienzan a separarse las gráficas correspondientes a las cuatro escalas, cada una de las cuales tenderá asintóticamente a un valor de tiempo medio de envejecimiento. Esto explica que las curvas de Poder antioxidante/Nº Saca diverjan al aumentar el número de saca, ya que cada escala tiende a un valor de tiempo medio de envejecimiento. Esta divergencia según las escalas se traduce en un ordenamiento de las escalas de mayor a menos vejez, en el que la Solera presenta los mayores valores de poder antioxidante, seguida de la primera, segunda y tercera criadera, que posee los valores menores.

En la *figura 42* se muestra la evolución del poder antioxidante en el sistema de añadas. En la primera mitad de la gráfica, se observa, a partir de la saca 13, un aumento importante del poder antioxidante. Si se compara el poder antioxidante en la añada con el de la escala Solera del sistema dinámico, se observa que antes de la saca 15, el poder antioxidante de la solera muestra un aumento gradual, mientras que la añada presenta un ligero aumento inicial, seguido de disminución. Sin embargo, a partir de esta saca 15, el poder antioxidante en la solera disminuye, probablemente debido al efecto de dilución por adición de aguardiente joven, mientras que el poder antioxidante de la añada muestra un aumento considerable.

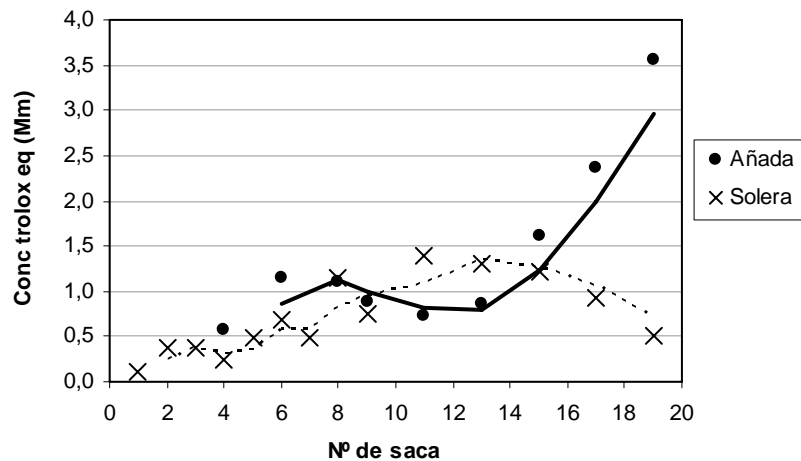


Figura 42: Poder antioxidante en el sistema de Añadas.

6.5. PODER ANTIOXIDANTE EN BRANDIES DE JEREZ COMERCIALES

Una vez estudiada la evolución del poder antioxidante en la solera piloto, se procedió a medir el poder antioxidante de *Brandies de Jerez* comerciales. En la *tabla 36* se muestran los valores medios de poder antioxidante de los *Brandies de Jerez* comerciales y del ensayo de envejecimiento. Los datos relativos a los *Brandies de Jerez* comerciales no cumplieron las condiciones de normalidad y homocedasticidad necesarias para la aplicación de tests paramétricos, por ello las comparaciones entre las medias se realizarán mediante el test de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos. Los resultados obtenidos reflejan que el poder antioxidante aumenta de los brandies Solera, a los Solera Reserva y a los Solera Gran Reserva, de forma que, si se comparan estadísticamente las medias de los tres grupos de brandies, se observan diferencias significativas tanto para los *Brandies de Jerez* comerciales ($p = 0,0055$) como para los del ensayo de envejecimiento ($p = 0,0056$). Por tanto, se podría concluir que el poder antioxidante aumenta con el tiempo de permanencia en la bodega, es decir, de Solera a Solera Reserva y de éstos a Solera Gran Reserva.

Los *Brandies de Jerez* comerciales pertenecientes a los grupos Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva tienen mayor poder antioxidante que los correspondientes brandies del ensayo de envejecimiento. Esta diferencia se podría

atribuir al hecho de que la asignación de las categorías se basa, en el caso de los *Brandies de Jerez* comerciales, en tiempos mínimos de envejecimiento y no en rangos de edad, como en los brandies del ensayo de envejecimiento. No se descarta sin embargo que los tratamientos y adiciones a las que se someten de manera habitual los *Brandies de Jerez* comerciales (y que no se han realizado en los brandies del ensayo de envejecimiento) contribuyan en alguna proporción a su mayor poder antioxidante. No obstante, el test de Kruskal-Wallis sólo ha reflejado diferencias estadísticamente significativas entre los grupos Solera Reserva de ambos tipos de brandy ($p = 0,0063$). Como se observa en los diagramas de cajas y bigotes* representados en la misma escala (figuras 43 y 44), los *Brandies de Jerez* comerciales presentan una mayor dispersión que los del sistema de envejecimiento, lo que podría explicarse también por el solapamiento entre categorías descrito anteriormente, además de tratarse de brandies procedentes de distintas bodegas, cuyos métodos de elaboración pueden diferir en cierta medida. Esta dispersión es mayor en los *Brandies de Jerez* comerciales Solera y Solera Gran Reserva, como lo ponen de manifiesto los elevados *CV* de estos grupos en la tabla 36.

	Sistema envejecimiento				Brandies de Jerez comerciales			
	Media	Mínimo	Máximo	C.V.	Media	Mínimo	Máximo	C.V.
S	0,39	0,01	0,77	58,09	0,61	0,04	2,58	127,16
SR	0,66	0,07	1,40	49,83	2,00	0,02	7,49	97,03
SGR	0,89	0,51	1,22	32,70	2,23	0,09	9,95	118,67

Tabla 36: Valores de poder antioxidante de los *Brandies de Jerez* comerciales y del ensayo de envejecimiento. (C.V.: coeficiente de variación).

* Un diagrama de cajas y bigotes resume la distribución de una variable a través de tres componentes: un punto central que indica la tendencia (media), una caja que refleja la variabilidad alrededor de esa tendencia central (desviación estándar) y los bigotes alrededor de la caja que muestran el rango de la variable (1,96 veces la desviación estándar, que representa el 95 % del intervalo normal de confianza).

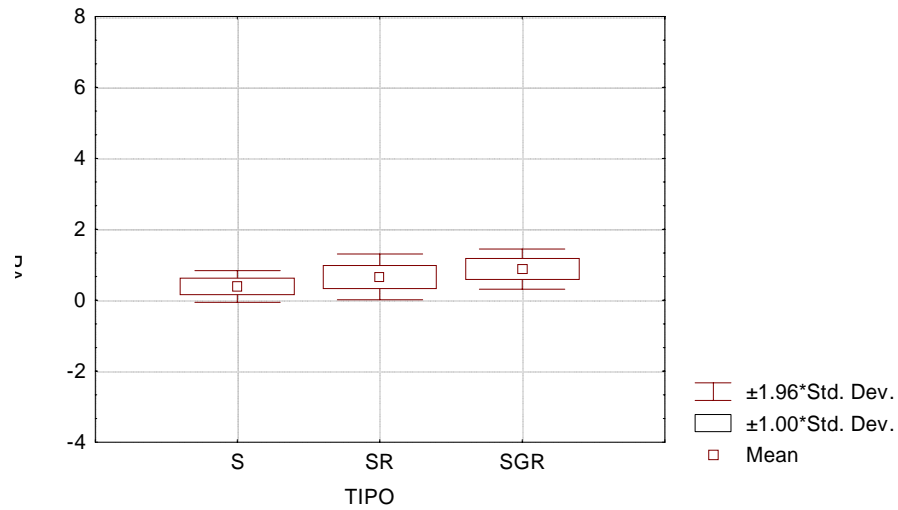


Figura 43: Diagrama de cajas y bigotes de los brandies del sistema de envejecimiento.

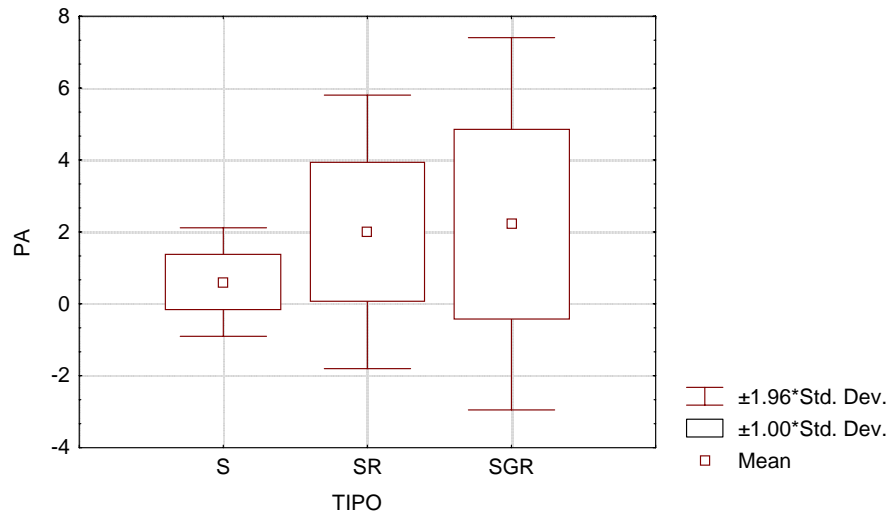


Figura 44: Diagrama de cajas y bigotes de los Brandies de Jerez comerciales.

6.6. PODER ANTIOXIDANTE DE EXTRACTOS AROMÁTICOS, MACERACIONES Y COLORANTES CAMELO

En este apartado se ha medido el poder antioxidante de diversas sustancias que son adicionadas al brandy después de su envejecimiento en barrica y previamente a su comercialización. Estas adiciones constituyen una práctica tradicional en la elaboración del *Brandy de Jerez* y tienen como objetivo dar tipicidad y carácter diferenciador a los *Brandies de Jerez* resultantes. Entre las sustancias adicionadas se encuentran las infusiones y extractos hidroalcohólicos obtenidos con uva pasa, ciruela pasa, fibras de madera de roble, pericarpio de almendra, vainas de vainilla y de nueces verdes. También está autorizada la edulcoración con azúcares naturales, como el vino dulce, y el ajuste del color final con colorante caramelo (de sacarosa, de glucosa o de mosto de uva).

En la *tabla 37* se recogen los datos de poder antioxidante correspondientes a los extractos hidroalcohólicos analizados y varios vinos dulces (Pedro Ximénez). En la parte izquierda de la tabla, se presentan los datos relativos a las proporciones a las que suelen adicionarse estas sustancias. Como se observa, la mayoría de los extractos, excepto el de roble C, no demuestran poder antioxidante a estas concentraciones. No obstante, estas proporciones, que han sido catalogadas como habituales, pueden variar entre distintas bodegas, por ello se procedió a medir el poder antioxidante de los extractos hidroalcohólicos a concentraciones mayores, con el objetivo de verificar si estas sustancias podían aportar poder antioxidante al brandy si eran añadidas en mayores cantidades. En este caso, se detectó cierto poder antioxidante en los extractos de ciruela pasa, almendra, robles A y C, y vainilla (datos en negrita en la tabla). Se consideró que los extractos de nuez, roble T y uva pasa presentaban un escaso poder antioxidante. Los vinos dulces fueron analizados en las mismas proporciones a las que se suelen añadir al brandy (similares al extracto de ciruela) y presentaron valores bajos o despreciables de poder antioxidante.

Extracto o maceración	Proporción habitual	Poder antioxidante	Proporción mayor que la habitual	Poder antioxidante
Ciruela pasa	8mL/L	< LD	20mL/L	0,33
Almendra	4mL/L	< LD	10mL/L	0,19
Nuez	8mL/L	< LD	20mL/L	< LD
Roble A	2mL/L	< LD	5mL/L	0,24
Roble C	2mL/L	0,21	5mL/L	1,45
Roble T	2mL/L	< LD	5mL/L	0,04
Uva pasa	8mL/L	< LD	20mL/L	< LD
Vainilla	1mL/L	< LD	2,5mL/L	0,13
Vinos dulces	8mL/L	0,00001-0,07	-	-

Tabla 37: Poder antioxidante de infusiones y extractos hidroalcohólicos empleados habitualmente en la elaboración del Brandy de Jerez.

También se evaluó el poder antioxidante de los tres tipos de colorante caramelo (tabla 38) empleados habitualmente en la elaboración del *Brandy de Jerez* (de glucosa, de sacarosa y de mosto de uva). Como el colorante caramelo se adiciona para ajustar el color, y por tanto no existen referencias relativas a las concentraciones empleadas, se procedió a medir el poder antioxidante de los caramelos a diferentes concentraciones. El colorante caramelo de glucosa fue el que presentó un mayor poder antioxidante, seguido del caramelo de sacarosa, mientras que los caramelos de mosto analizados presentaron escaso poder antioxidante.

El solapamiento entre categorías que se observa en los *Brandies de Jerez* comerciales, junto con el aporte de poder antioxidante de los extractos, caramelos y vinos dulces, podrían contribuir, en cierta medida, al aumento de poder antioxidante de los *Brandies de Jerez* comerciales respecto a los procedentes del ensayo de envejecimiento.

Tipo de caramelo	Concentración medida	Poder antioxidante
CM1 (mosto)	3,07 g/L	< LD
CM1 (mosto)	6,62 g/L	< LD
CM3 (mosto)	5,64 g/L	0,08
CG3 (glucosa)	5,84 g/L	0,89
CS1 (sacarosa)	5,05 g/L	0,20

Tabla 38: Poder antioxidante de los tres tipos de colorante caramelo empleados en la elaboración del Brandy de Jerez.

6.7. PODER ANTIOXIDANTE EN DESTILADOS ENVEJECIDOS DE DISTINTO ORIGEN

En la *tabla 39* se muestran los valores medios de poder antioxidante de otros destilados comerciales de distintos orígenes, junto con los correspondientes a las tres categorías de *Brandies de Jerez*. El mayor poder antioxidante corresponde a los *Brandies de Jerez Solera Gran Reserva*, seguidos de los coñacs (no existen diferencias significativas entre ambos, $p = 0,1405$), *Brandies de Jerez Solera Reserva*, brandies españoles, armañacs, brandies sudafricanos y franceses. No se encontraron diferencias significativas entre *Brandies de Jerez Solera Reserva* y brandies españoles ($p = 0,1346$), ni entre *Brandies de Jerez Solera Reserva* y armagnacs ($p = 0,1983$).

Entre los destilados de distinto origen, los brandies sudafricanos poseen la mayor dispersión, seguidos por los destilados españoles. Los armañacs presentaron el menor *CV*. En el caso de los *Brandies de Jerez* comerciales, el poder antioxidante medio de los brandies Solera Reserva constituye un valor intermedio entre los valores medios de poder antioxidante de los coñacs y otros brandies españoles no elaborados en la zona de Jerez, no encontrándose diferencias estadísticamente significativas en la comparación del poder antioxidante de los *Brandies de Jerez* comerciales de la categoría Solera Reserva con ambos grupos de muestras (coñacs y brandies españoles de otros orígenes) mediante el test de Kruskal-Wallis ($p = 0,5351$ y $p = 0,9301$, respectivamente).

	Destilados comerciales			
	Media	Mínimo	Máximo	C.V.
S	0,61	0,04	2,58	127,16
SR	2,00	0,02	7,49	97,03
SGR	2,23	0,09	9,95	118,67
Armañacs	1,17	0,65	1,51	35,20
Coñacs	2,16	0,70	4,89	54,13
Espanoles	1,94	0,28	5,17	91,20
Franceses	0,70	0,31	1,09	78,33
Sudafricanos	0,90	0,16	1,85	96,72

Tabla 39: Valores de poder antioxidante de destilados comerciales de distintos orígenes y Brandies de Jerez.

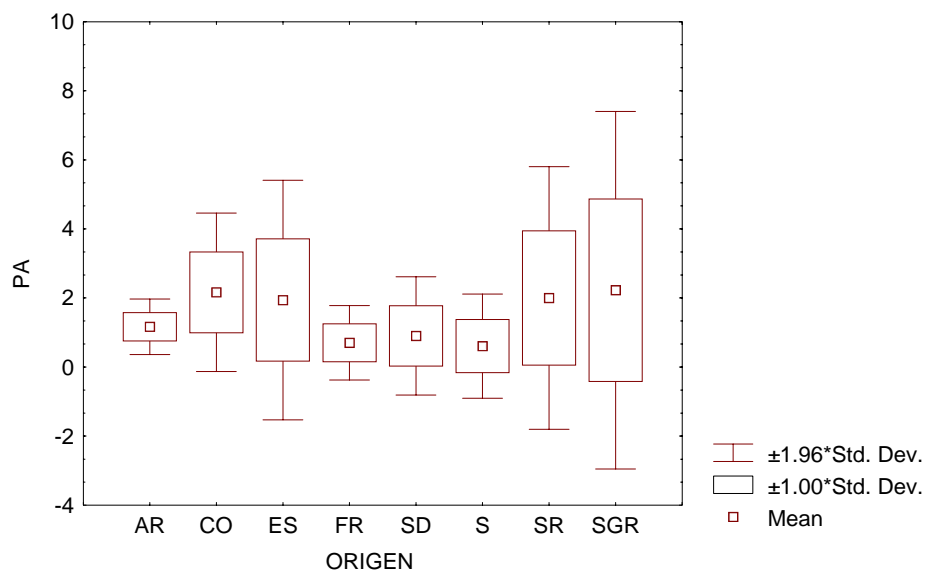


Figura 45: Diagrama de cajas y bigotes de destilados comerciales de distintos orígenes (AR: armagnacs; CO: cognacs, ES: destilados españoles de distinto origen; FR: destilados franceses de distinto origen; SD: destilados sudafricanos; S: Brandies de Jerez Solera; SR: Brandies de Jerez Solera Reserva; SGR: Brandies de Jerez Solera Gran Reserva).

7. ESPECTROSCOPIA INFRARROJA

7.1. INTRODUCCIÓN

En este apartado se estudiarán las relaciones entre el espectro obtenido en la región del infrarrojo medio de un brandy y su edad. El espectro infrarrojo será tratado aquí de forma global, sin tener en cuenta los compuestos responsables de las distintas partes del espectro, ya que el trabajo está enfocado a la aplicación práctica de la espectroscopia infrarroja como criterio de calidad en la elaboración del *Brandy de Jerez*.

La selección del rango (o rangos) de números de onda a incluir en el tratamiento estadístico está encaminada a excluir aquellas zonas con excesivo ruido, por ejemplo, debido a la absorción del agua. Por este motivo, se utilizará la región de $900\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ como rango espectral útil³⁷. En las *figuras 46 y 47* pueden verse los espectros infrarrojos de un brandy Solera, un Solera Reserva y un Solera Gran Reserva, tanto para los brandies del ensayo de envejecimiento como para los comerciales, respectivamente.

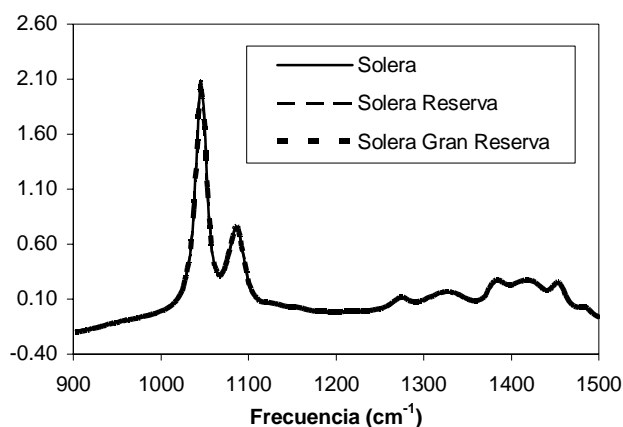


Figura 46: Espectros infrarrojos de tres brandies del ensayo de envejecimiento pertenecientes a los grupos Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva.

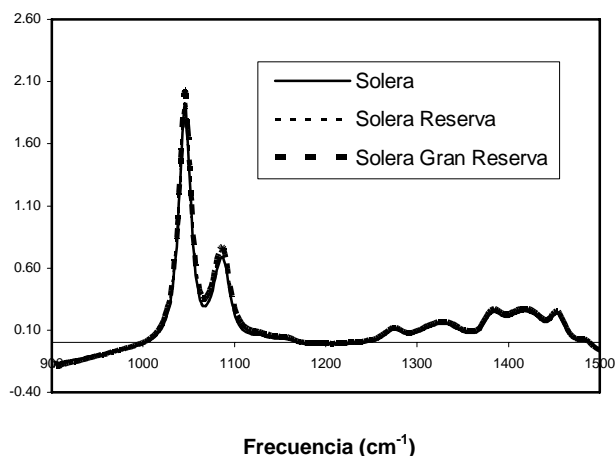


Figura 47: Espectros infrarrojos de tres Brandies de Jerez comerciales pertenecientes a los grupos Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva.

7.2. CLASIFICACIÓN DE LOS BRANDIES

En este apartado se estudiará la capacidad del espectro infrarrojo para clasificar los *Brandies de Jerez* comerciales y del ensayo de envejecimiento en función de su categoría comercial de Solera, Solera Reserva o Solera Gran Reserva y de la escala de envejecimiento de la que proceden, a saber, Solera, Primera Criadera, Segunda Criadera y Tercera Criadera (sólo en el caso de los brandies del ensayo de envejecimiento). Para ello, se utilizarán dos combinaciones de técnicas estadísticas que denominaremos *técnicas clásicas* y *técnicas novedosas*. En relación a las técnicas clásicas, los componentes principales obtenidos en el PCA se aplicarán a la clasificación de los brandies (tanto comerciales como procedentes del ensayo de envejecimiento) mediante análisis lineal discriminante (PCA-LDA). Las técnicas novedosas consistirán en la utilización de las amplitudes obtenidas por transformada de Fourier (FT) como variables de entrada para las redes neuronales artificiales (ANN), que se aplicarán a la clasificación de los *Brandies de Jerez* comerciales (FT-ANN). La combinación TF-RNA ha sido descrita previamente por Palacios-Santander, J.M. et al.³⁸. Aunque el procedimiento FT-ANN es mucho más complicado desde el punto de vista matemático, su uso podría estar justificado si su habilidad de predicción (tanto para clasificación como para regresión) fuese mejor que la de los métodos convencionales y pudiera, por tanto, poner de relieve las relaciones entre el espectro infrarrojo de un *Brandy de Jerez* y su edad.

La combinación FT-ANN no se ha aplicado a la clasificación de las muestras del ensayo de envejecimiento por considerarse insuficiente el número de muestras del grupo Solera Gran Reserva disponibles, ya que las redes neuronales precisan para su entrenamiento de un número elevado de muestras de todos los tipos que intervengan en la clasificación.

7.3. REDUCCIÓN DE DIMENSIONES

El trabajo con espectros tiene como consecuencia que el número de variables predictoras en la matriz de datos original sea muy elevado (en este caso, 156 variables, correspondientes a las absorbancias de las 156 frecuencias del espectro entre 900 y 1500 cm⁻¹). El procedimiento previo de reducción de dimensiones permitirá comprimir la información contenida en los datos de partida, con el fin de simplificar el desarrollo de los posteriores modelos de clasificación y predicción. Al mismo tiempo que conserva la mayor cantidad de información relevante posible, se eliminan los efectos ocasionados por el ruido aleatorio u otras posibles perturbaciones. En este trabajo, se han empleado dos técnicas para la reducción de dimensiones de la matriz original de datos: el análisis de componentes principales (PCA) y la transformada de Fourier (FT). El porcentaje de reducción de dimensiones se ha calculado de la siguiente forma:

$$Porcentaje_{reducción} = \left(\frac{z}{x} \right) \cdot 100$$

Donde z es el número de variables obtenidas tras el proceso de reducción y x el número de variables originales (espectro infrarrojo de partida).

En el caso de las redes neuronales, cada una de las variables será asociada a una neurona de la capa en entrada. Por este motivo, es evidente la imposibilidad de trabajar con las variables originales, no sólo desde el punto de vista de la carga computacional, puesto que se trabaja con información redundante, sino también, y principalmente, por la gran dificultad que implica desarrollar un modelo neuronal de tales características, proceso que se ve indudablemente empañado por la aparición del sobreajuste. De esta forma, los procedimientos de reducción de dimensiones o de compresión de información, minimizan el número de entradas a la red y, por tanto, el número de parámetros ajustables, manteniendo la mayor parte de la información contenida en la señal. Con este objetivo de evitar el sobreajuste y obtener modelos neuronales lo más sencillos posible, se han utilizado redes neuronales con sólo tres capas (entrada, oculta y salida), lo que reduce la cantidad de nodos ocultos, así como de parámetros ajustables.

7.4. CLASIFICACIÓN DE LOS BRANDIES MEDIANTE PCA-LDA

A partir del PCA, se seleccionaron 20 componentes principales tanto para los *Brandies de Jerez* comerciales como para los del ensayo de envejecimiento. El porcentaje de varianza explicada acumulada por los componentes principales se muestra en la *tabla 40*.

Para seleccionar el número de componentes principales, se aplicó el ALD a matrices de datos (de *Brandies de Jerez* comerciales y del ensayo de envejecimiento) con 3, 5, 10, 15 y 20 componentes. Se observó que los porcentajes de clasificación aumentaban considerablemente al ir añadiendo componentes principales, además de que en los LDAs con 3, 5, 10 y 15 el modelo incluía (aunque no a todos los componentes principales) siempre al último componente principal, lo que hacía pensar que se necesitaban más componentes, por ello se fue aumentando el número de componentes principales hasta llegar a 20, en cuyo caso el modelo no incluía ya al último componente principal (el último componente principal utilizado fue el 17 en los *Brandies de Jerez* comerciales y el 19 en los del ensayo de envejecimiento). Por este motivo, además de los buenos resultados proporcionados por los LDAs, se seleccionaron 20 componentes tanto para los *Brandies de Jerez* comerciales como para los del ensayo experimental. De esta forma, el porcentaje de reducción de dimensiones obtenido fue del 12,8 % (la dimensión de los datos se reduce hasta un 12,8 % de la original).

Estos componentes principales se utilizaron como variables independientes para la clasificación de los brandies mediante LDA. En primer lugar, se estudió si el espectro infrarrojo era capaz de diferenciar las escalas de envejecimiento de los brandies, tal como ocurriera con los azúcares. Esta diferenciación entre escalas se basa en la divergencia observada en los tiempos de envejecimiento al aumentar el número de saca (*figura 20*). Como esta diferenciación es mayor al aumentar el número de saca, se calculó el porcentaje de clasificación global entre escalas utilizando todas las sacas y a continuación se fueron eliminando las primeras. No obstante, los porcentajes de clasificación se mantuvieron constantes al eliminar las primeras sacas, proporcionando una clasificación global del 84 %. Esta clasificación entre escalas se confirma en la *figura 48*, que muestra cómo la representación gráfica de los dos primeros componentes principales refleja la separación entre las escalas (al no tratarse de una técnica supervisada, el análisis de componentes principales pone de manifiesto la estructura de los datos).

Posteriormente, se realizó un LDA para clasificar los *Brandies de Jerez* comerciales y del ensayo de envejecimiento según la categoría comercial de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva. En las *tablas 41 y 42* se muestran los

porcentajes de clasificación obtenidos mediante LDA para los brandies comerciales y del ensayo de envejecimiento. Los gráficos de las muestras sobre el plano de las variables canónicas (*figuras 49 y 50*) ponen de manifiesto la diferenciación entre las tres categorías para *Brandies de Jerez* comerciales y del ensayo de envejecimiento.

Componente principal	Varianza explicada (%)	
	Brandies ensayo envejecimiento	Brandies de Jerez comerciales
1	86,35	87,98
2	98,67	97,85
3	99,40	98,97
4	99,64	99,62
5	99,77	99,75
6	99,80	99,83
7	99,85	99,86
8	99,87	99,89
9	99,88	99,91
10	99,89	99,92
11	99,91	99,94
12	99,93	99,95
13	99,93	99,96
14	99,94	99,96
15	99,94	99,97
16	99,95	99,97
17	99,95	99,97
18	99,96	99,98
19	99,96	99,98
20	99,96	99,98

Tabla 40: Porcentaje de varianza explicada por los componentes principales en los Brandies de Jerez comerciales y del ensayo de envejecimiento.

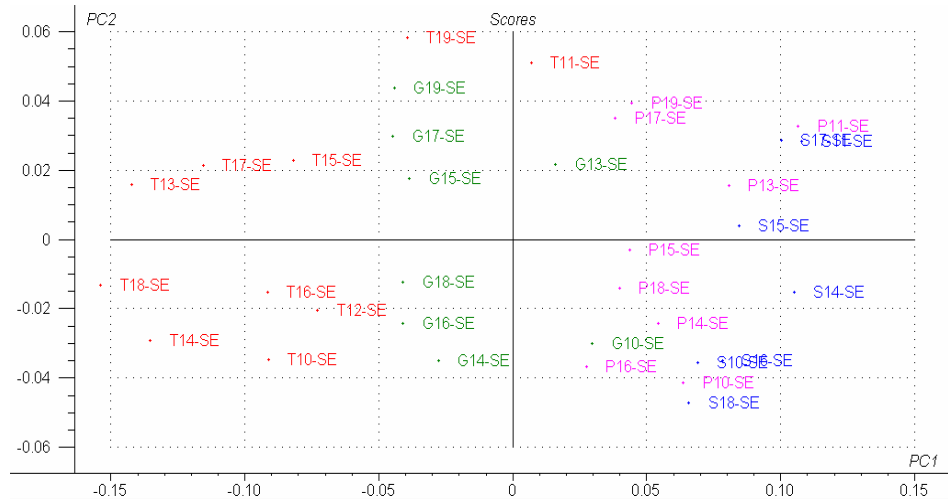


Figura 48: Clasificación por escalas de envejecimiento mediante análisis de componentes principales (T: Tercera Criadera, G: Segunda Criadera, P: Primera Criadera, S: Solera).

	Porcentaje correcto	S	SR	SGR
S	88,89	16	2	0
SR	82,86	5	29	1
SGR	100,00	0	0	6
Total	86,44	21	31	7

Tabla 41: Matriz de clasificación para los brandies del sistema de envejecimiento (S: Solera; SR: Solera Reserva; SGR: Solera Gran Reserva).

	Porcentaje correcto	S	SR	SGR
S	100,00	20	0	0
SR	88,89	2	16	0
SGR	78,26	0	5	18
Total	88,52	22	21	18

Tabla 42: Matriz de clasificación para los Brandies de Jerez comerciales (S: Solera; SR: Solera Reserva; SGR: Solera Gran Reserva).

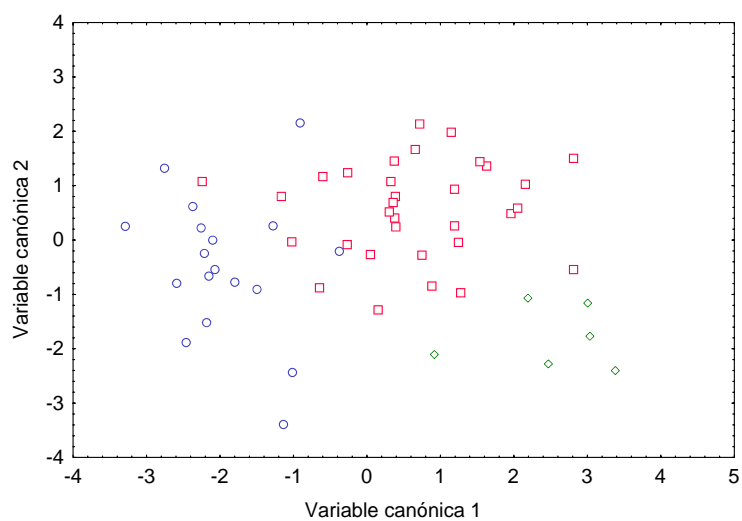


Figura 49: Análisis canónico de la diferenciación por categorías para los brandies del ensayo de envejecimiento (Solera \circ ; Solera Reserva \square ; Solera Gran Reserva \triangle).

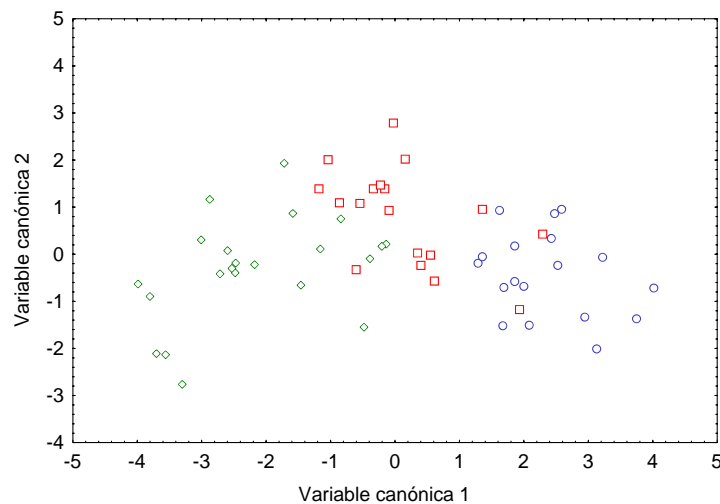


Figura 50: Análisis canónico de la diferenciación por categorías para los Brandies de Jerez comerciales (Solera \circ ; Solera Reserva \square ; Solera Gran Reserva \diamond).

A partir de los resultados del LDA, se observan diferencias entre ambos grupos de brandies, ya que los mejores porcentajes de clasificación (100 %) se obtuvieron para los brandies Solera Gran Reserva del sistema de envejecimiento y Solera de los comerciales, mientras que los peores porcentajes correspondieron a los brandies Solera Reserva del sistema de envejecimiento (82,86 %) y a los *Brandies de Jerez* comerciales Solera Gran Reserva (78,26 %). Estas diferencias entre los *Brandies de Jerez* comerciales y del ensayo de envejecimiento se atribuyen a que los *Brandies de Jerez* comerciales han sufrido la adición de extractos y caramelos, práctica que no se ha realizado en los brandies del sistema de envejecimiento. Además, en el caso de los *Brandies de Jerez* comerciales, es preciso tener en cuenta el solapamiento existente entre las categorías, debido a que la asignación de las categorías se basa en tiempos mínimos de envejecimiento. Este solapamiento contribuye a empeorar los porcentajes de clasificación. A pesar de todo, los porcentajes de clasificación globales son similares para ambos grupos de muestras: 86,44 % para el sistema de envejecimiento y 88,52 % para los *Brandies de Jerez* comerciales. Estos elevados porcentajes ponen de relieve la capacidad del espectro infrarrojo para diferenciar las categorías comerciales del brandy.

7.5. CLASIFICACIÓN DE LOS BRANDIES MEDIANTE FT-ANN

Aunque el proceso de reducción de dimensiones mediante transformada de Fourier se trata con mayor profundidad en los antecedentes (5. *Tratamientos estadísticos*), a continuación se presenta un pequeño resumen del mismo. Tras un filtrado previo, se definió una frecuencia de corte que proporcionase un número aceptable de dimensiones y un error de recomposición para la señal lo más bajo posible. La elección de dicha frecuencia de corte fue fundamental, puesto que el número de dimensiones (amplitudes que representaban a las señales) se asoció posteriormente con las neuronas de entrada a la red neuronal. Por tanto, si cada señal se redujo a 15 amplitudes, esto significa que el número de neuronas de la capa de entrada debía ser también de 15.

De esta forma, el proceso de filtrado y reducción de dimensiones de los espectros infrarrojos mediante transformada de Fourier proporcionó 15 amplitudes (para *Brandies de Jerez* comerciales y del sistema de envejecimiento), como resultado de aplicar una amplitud mínima de 4,5, lo que supuso un error de recomposición del 9,35 % para los brandies del sistema de envejecimiento y del 8,80 % para los *Brandies de Jerez* comerciales. En ambos casos, el porcentaje de reducción de dimensiones fue del 9,6 %. Se consideró que 15 era el mejor número de amplitudes para sustituir a las variables originales ya que, si se quiere reducir aún más a 14 amplitudes, el aumento en la amplitud de corte supondría un error de recomposición que estaría alrededor del 12 % en ambos casos, por lo que, a partir de 15 amplitudes, la reducción de dimensiones no se encuentra compensada por el aumento en el error de recomposición. Como se mencionó anteriormente, las muestras del ensayo de envejecimiento no se consideraron apropiadas para realizar la clasificación mediante ANN. No obstante, las amplitudes obtenidas se utilizarán más adelante para la predicción del tiempo de envejecimiento usando ANN.

Las amplitudes obtenidas en el análisis de FT de los espectros infrarrojos se utilizaron como variables para la clasificación de los *Brandies de Jerez* comerciales según las categorías de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva. Para ello, fue necesario optimizar el número de neuronas de la capa oculta. Una vez fijado este parámetro, se procedió a afinar el modelo mediante la optimización de la velocidad de aprendizaje. Para la optimización, se ha fijado en 20000 el número máximo de ciclos utilizados para el entrenamiento y en 30 el número de ciclos sin mejora para detener la iteración. Durante el entrenamiento de la red, se ha utilizado el método de validación cruzada.

En la *tabla 43* se muestran los resultados de la optimización de la topología de la red. Durante la optimización del número de neuronas de la capa oculta, se ha utilizado una velocidad de aprendizaje intermedia de 0,7 (recomendada por el programa). Como la capa de entrada tiene 15 neuronas y la de salida 3 (las tres categorías de la clasificación), la optimización se realizará entre 2 y 10 neuronas, que se considera un rango amplio de trabajo, ya que el programa no permite trabajar con una sola neurona y, por otra parte, no se considera aconsejable utilizar más de 10 neuronas en este caso, lo que podría acarrear problemas de sobreajuste. A partir de los resultados de la *tabla 43*, se ha utilizado el valor medio del porcentaje de clasificación de las tres categorías como criterio para seleccionar la topología óptima. De esta forma, los mejores resultados se consiguieron con 2 neuronas en la capa oculta: 94,44 %, 59,53 % y 79,36 % para los grupos Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva, respectivamente. El promedio del porcentaje de clasificación para esta topología fue del 77,78 %, valor que no se superó aumentando el número de neuronas. El hecho de utilizar un modelo con pocas neuronas proporciona una red neuronal más sencilla y por tanto, con menos posibilidades de presentar problemas de sobreajuste.

Posteriormente, se procedió a optimizar la velocidad de aprendizaje con una red de 2 neuronas en la capa oculta. Como la función de transferencia es sigmoideal, se emplearon valores entre 0,5 y 1. No obstante, ninguna de las velocidades de aprendizaje ensayadas generó unos porcentajes de clasificación mayores que los obtenidos anteriormente con una velocidad de 0,7, por lo que se concluyó que ésta era la velocidad óptima en este caso. De esta forma, la red neuronal óptima para la clasificación de los *Brandies de Jerez* comerciales consta de 2 neuronas en la capa oculta y trabaja a una velocidad de aprendizaje de 0,7. Por tanto, la topología final de la red neuronal sería 15-2-3 (neuronas capa entrada-neuronas capa oculta-neuronas capa salida).

Neuronas capa oculta	Velocidad de aprendizaje	Porcentaje correcto de clasificación			
		S	SR	SGR	Promedio
2	0,7	94,44	59,53	79,36	77,78
3	0,7	94,44	54,76	80,95	76,72
4	0,7	88,89	54,76	77,78	73,81
5	0,7	92,59	47,62	79,36	73,19
6	0,7	88,89	45,24	74,60	69,58
7	0,7	94,44	47,62	80,95	74,34
8	0,7	88,89	50,00	80,95	73,28
9	0,7	90,74	47,62	79,36	72,57
10	0,7	90,74	47,62	74,60	70,99
2	0,5	90,74	57,14	82,54	76,81
2	0,6	90,74	50,00	80,95	73,89
2	0,8	92,59	50,00	84,12	75,57
2	0,9	88,89	52,38	82,54	74,60
2	1	90,74	47,62	84,13	74,16

Tabla 43: Optimización de la topología de una red neuronal para clasificar los *Brandies de Jerez* comerciales según las categorías de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva (topología óptima en negrita).

Como se extrae de la comparación con PCA-LDA, los porcentajes de clasificación conseguidos mediante FT-ANN (94,44 %, 59,53 % y 79,36 % para los grupos Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva, respectivamente) son inferiores a los obtenidos mediante PCA-LDA, tanto si se trata de porcentajes medios como de porcentajes por categorías. Por ello, se considera a este último como un tratamiento estadístico más apropiado para la diferenciación entre las categorías de los *Brandies de Jerez* comerciales. No obstante, los resultados obtenidos mediante ANN, siguen confirmando la relación entre el espectro infrarrojo y la edad del brandy, que determina las tres categorías. En el caso de los brandies del ensayo de envejecimiento, no es posible comparar ambas técnicas estadísticas, ya que, como se explicó anteriormente, las redes neuronales no son aplicables en los brandies del ensayo de envejecimiento. De todas formas, el PCA-LDA también proporcionó buenos resultados para la diferenciación de estos brandies, que serán confirmados mediante las regresiones posteriores.

7.6. PREDICCIÓN DEL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO

Los resultados obtenidos en las clasificaciones revelan que existe una diferenciación de los brandies según la categoría comercial que se asigna en base a los tiempos de envejecimiento. Por ello, se prevé que exista cierta relación entre el espectro infrarrojo de un brandy y su tiempo medio de envejecimiento. Esta relación será estudiada en el presente epígrafe, en primer lugar para verificar su existencia y después para tratar de definirla mediante diferentes métodos estadísticos de regresión: *técnicas clásicas* y *técnicas novedosas*. Entre las técnicas clásicas se utilizará la regresión por mínimos cuadrados parciales (PLSR) y la regresión por componentes principales (PCR), con distintos pre-tratamientos de datos. Las técnicas novedosas consistirán, al igual que en las clasificaciones, en la combinación de la transformada de Fourier y las redes neuronales artificiales (FT-ANN), que ahora serán aplicadas a la regresión. Estas regresiones se realizarán sobre las muestras del ensayo experimental de envejecimiento, de las que se conoce el tiempo medio de envejecimiento.

7.7. REDUCCIÓN DE DIMENSIONES

En el caso de las técnicas clásicas, no es necesaria una etapa previa de reducción de dimensiones ya que, en la regresión por mínimos cuadrados parciales y por componentes principales, el primer paso consiste en la obtención de los componentes principales o factores*. Posteriormente el programa realiza la regresión con el número óptimo de las mismas.

La regresión mediante redes neuronales artificiales se realizará a partir de las variables obtenidas anteriormente para las muestras del ensayo de envejecimiento mediante la transformada de Fourier (descritas en el apartado 7.5. *Clasificación de los brandies mediante FT-ANN*). Es decir, se obtuvieron 15 variables, con un error de recomposición asociado del 9,35 % y un porcentaje de reducción de dimensiones del 9,6 %.

* Las variables latentes que calcula un modelo de mínimos cuadrados parciales no son exactamente componentes principales, por ello nos referiremos a ellas como *factores*, (también en la regresión por componentes principales).

7.8. PREDICCIÓN DEL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO

Para la regresión mediante técnicas clásicas se utilizaron, como se menciona anteriormente, la regresión por componentes principales y la regresión por mínimos cuadrados parciales. La regresión por mínimos cuadrados parciales es válida en todas las situaciones, especialmente si existe correlación entre las variables predictoras (X), como ocurre en este caso, ya que se parte de un espectro infrarrojo. La regresión por componentes principales es una alternativa a la PLSR que realiza una regresión lineal múltiple de los componentes principales obtenidos a partir de las variables originales. Sin embargo, no se ha realizado la regresión lineal múltiple (MLR) a partir de las variables originales, ya que este método sólo debe ser utilizado cuando las variables predictoras (X) no están correlacionadas, condición que no se cumple en un espectro infrarrojo.

La PCR y PLSR se han ensayado con distintos pre-tratamientos de los datos, que son especialmente aplicables con datos espectrales: suavizado por media móvil, suavizado Savitzky-Golay, derivada Norris, primera derivada Savitzky-Golay y segunda derivada Savitzky-Golay. Para evaluar el efecto de estas transformaciones sobre el modelo de regresión, también se han calculado PCR y PLSR sin ningún pretratamiento de los datos espectrales, a excepción de la detección de outliers (se ha realizado en todos los cálculos presentados en esta Memoria de Tesis Doctoral y según los criterios mencionados en el capítulo 5. *Tratamientos estadísticos*, de los *antecedentes*). En la *tabla 44* se muestran los resultados de los distintos ensayos de calibración multivariante, todos ellos realizados mediante validación-cruzada. También se muestran los parámetros analíticos relacionados con la bondad del ajuste (coeficiente de correlación, pendiente) y con la capacidad predictiva de los modelos (error cuadrático medio de validación: ECM o RMSEP), así como el número óptimo de factores de cada modelo.

Como se observa en la *tabla 44*, los modelos a los que corresponde un menor error cuadrático medio de validación (0,57-0,59 años) son las combinaciones del suavizado Savitzky-Golay con PCR y PLSR, y del suavizado mediante media móvil con PLSR. Se demuestra, por tanto, que el pretratamiento de los datos espectrales (en este caso, el suavizado del espectro) mejora el modelo de regresión. Si se comparan los tres métodos mencionados, se observa que los métodos basados en PLSR necesitan un menor número de factores que los de PCR, ya que, según se mencionó en los *antecedentes* (5. *Tratamientos estadísticos*), en el modelo de PLSR la información sobre los valores de referencia está implicada en la construcción de los factores.

Tratamiento previo	Regresión	Grupo de muestras	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación	ECM validación cruzada	Número óptimo factores
-	PCR	Calibración validación	0,76	0,39	0,87	0,46	14
Suavizado media móvil	PCR	Calibración validación	0,66	0,55	0,77	0,60	7
Suavizado Savitzky-Golay	PCR	Calibración validación	0,61	0,64	0,82	0,53	13
1ª Derivada Norris	PCR	Calibración validación	0,79	0,34	0,89	0,44	18
1ª Derivada Savitzky-Golay	PCR	Calibración validación	0,71	0,47	0,80	0,57	15
2ª Derivada Savitzky-Golay	PCR	Calibración validación	0,80	0,33	0,89	0,43	3
-	PLSR	Calibración validación	0,65	0,55	0,76	0,62	7
Suavizado media móvil	PLSR	Calibración validación	0,78	0,35	0,88	0,44	6
Suavizado Savitzky-Golay	PLSR	Calibración validación	0,64	0,58	0,77	0,60	6
Derivada Norris	PLSR	Calibración validación	0,20	1,29	0,45	0,85	10
1ª Derivada Savitzky-Golay	PLSR	Calibración validación	0,14	1,40	0,32	0,90	8
2ª Derivada Savitzky-Golay	PLSR	Calibración validación	0,78	0,35	0,89	0,44	12
Suavizado media móvil	PLSR	Calibración validación	0,67	0,53	0,77	0,61	6
Suavizado Savitzky-Golay	PLSR	Calibración validación	0,75	0,40	0,87	0,47	6
Derivada Norris	PLSR	Calibración validación	0,67	0,53	0,79	0,59	6
1ª Derivada Savitzky-Golay	PLSR	Calibración validación	0,77	0,36	0,88	0,45	10
2ª Derivada Savitzky-Golay	PLSR	Calibración validación	0,69	0,51	0,78	0,59	8
-	PLSR	Calibración validación	0,83	0,27	0,91	0,39	12
Suavizado media móvil	PLSR	Calibración validación	0,68	0,52	0,75	0,64	6
Suavizado Savitzky-Golay	PLSR	Calibración validación	0,82	0,29	0,91	0,40	10
Derivada Norris	PLSR	Calibración validación	0,67	0,54	0,76	0,62	8
1ª Derivada Savitzky-Golay	PLSR	Calibración validación	0,89	0,18	0,94	0,32	12
2ª Derivada Savitzky-Golay	PLSR	Calibración validación	0,53	0,75	0,57	0,85	6

Tabla 44: Ensayos de calibración multivariante con técnicas estadísticas clásicas.

Por otra parte, las 15 variables, obtenidas anteriormente para los brandies del sistema de envejecimiento mediante análisis de transformada de Fourier de los espectros infrarrojos, se utilizaron como variables de entrada a las redes neuronales artificiales, con el objetivo de desarrollar un modelo de regresión entre estas variables y el tiempo medio de envejecimiento de los brandies. Al igual que en los estudios de clasificación con ANN, fue necesario optimizar la topología de la red en función del número de neuronas de la capa oculta. Una vez fijado este parámetro, se optimizó la velocidad de aprendizaje. Para la optimización, se ha fijado en 100000 el número máximo de ciclos utilizados para el entrenamiento y en 100 el número de ciclos sin mejora para detener la iteración. Durante el entrenamiento de la red, se ha utilizado el método de validación cruzada.

En la *tabla 45* se muestran los resultados de la optimización de la topología de la red neuronal. Al igual que en la optimización de las redes neuronales para clasificación, cada topología se ha ensayado por triplicado y se han calculado los valores medios de RMSEP, que son los que aparecen en la *tabla 45*. Durante la optimización del número de neuronas de la capa oculta, se ha fijado una velocidad de aprendizaje de 0,7. Como la capa de entrada tiene 15 neuronas y la de salida 1 (el valor del tiempo medio de envejecimiento), la optimización se realizará, igual que en la clasificación, entre 2 y 10 neuronas. A partir de los datos de la mitad superior de la tabla, correspondientes a la optimización del número de neuronas de la capa oculta, se consideró que el número óptimo de neuronas era de 4 (como un compromiso entre valores bajos de RMSEP y un modelo sencillo), que se corresponde con un RMSEP de validación cruzada de 0,1679 años.

Posteriormente, se procedió a optimizar la velocidad de aprendizaje con una red de 4 neuronas en la capa oculta. Como la función de transferencia es sigmoidea, se emplearon valores entre 0,5 y 1. En este caso, el valor más bajo de RMSEP de validación cruzada correspondió a una velocidad de aprendizaje de 1, que se consideró la velocidad óptima. De esta forma, la red neuronal artificial de una mayor capacidad predictiva fue la formada por 4 neuronas en la capa oculta con una velocidad de aprendizaje de 1 (topología 15-4-1). Si se compara con los resultados de la clasificación con ANN, la topología óptima tiene ahora más neuronas, lo que puede ser reflejo de la mayor complejidad en el modelo de regresión.

Neuronas capa oculta	Velocidad aprendizaje	RMSEP validación cruzada
2	0,7	0,1764
3	0,7	0,1915
4	0,7	0,1679
5	0,7	0,1790
6	0,7	0,1705
7	0,7	0,1633
8	0,7	0,1612
9	0,7	0,1632
10	0,7	0,1612
4	0,5	0,1761
4	0,6	0,1970
4	0,8	0,1533
4	0,9	0,1622
4	1	0,1502

Tabla 45: Optimización de la topología de una red neuronal artificial para la predicción del tiempo medio de envejecimiento (topología óptima en negrita).

En este caso, las redes neuronales proporcionaron valor menores de RMSEP de validación cruzada (0,15 años para el modelo óptimo) que las técnicas clásicas (0,57-0,59 años para los mejores modelos). Por ello, se concluye que las redes neuronales tienen una mayor capacidad para modelizar la relación entre el espectro infrarrojo y el tiempo de envejecimiento de los brandies del ensayo experimental de envejecimiento.

En este capítulo se han utilizado diferentes tipos de técnicas estadísticas, clásicas y novedosas, para evaluar la existencia de una relación entre el espectro infrarrojo de un brandy, tratado de forma global, y su edad. A partir de los resultados obtenidos puede concluirse que el espectro infrarrojo es capaz de poner de manifiesto los cambios experimentados por el brandy durante el envejecimiento. Este parámetro requiere un tratamiento de datos adicional en comparación con el resto de parámetros estudiados, sin embargo, la sencillez y rapidez asociadas a su adquisición y los buenos resultados obtenidos, lo harían potencialmente aplicable al control de calidad en la elaboración del brandy. Entre las técnicas estadísticas utilizadas, la combinación PCA-LDA resultó la más apropiada para los estudios de diferenciación, mientras que la predicción del tiempo medio de envejecimiento mediante FT-ANN proporcionó los mejores resultados.

8. TRATAMIENTO CONJUNTO DE DATOS

8.1. INTRODUCCIÓN

Después de estudiar por separado cada uno de los parámetros medidos en el brandy (azúcares, compuestos volátiles, poder antioxidante y espectro infrarrojo), y en vista de las relaciones observadas entre cada uno de estos grupos de variables y el tiempo de envejecimiento (bien a través de técnicas de clasificación o de regresión), se plantea, como etapa final de este trabajo, estudiar la relación del conjunto de parámetros medidos en el brandy y el tiempo medio de envejecimiento. Este estudio se llevará a cabo, siguiendo el esquema de la presente Memoria de Tesis Doctoral, mediante la aplicación de los mencionados parámetros a la clasificación de los brandies en función de las categorías comerciales de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva. En función de los resultados obtenidos en esta diferenciación, se planteará una regresión para predecir el tiempo medio de envejecimiento de los brandies del ensayo experimental de envejecimiento a partir de dichos parámetros.

8.2. DIFERENCIACIÓN DE LOS BRANDIES DEL ENSAYO DE ENVEJECIMIENTO

En primer lugar, se estudiará la diferenciación de los brandies del ensayo de envejecimiento en función de las escalas de envejecimiento. Para ello, se recurrió al análisis lineal discriminante utilizando como variables independientes todos los parámetros estudiados con anterioridad, es decir, azúcares, compuestos volátiles, poder antioxidante y espectro infrarrojo. El elevado número de variables contenidas en los espectros infrarrojos podría descompensar la matriz de datos en relación al resto de parámetros, por lo que se utilizaron los 20 primeros componentes principales, que fueron previamente seleccionadas en las clasificaciones a partir de los espectros de infrarrojos. No obstante, el programa detectó grupos con varianza cero en los últimos componentes principales que impidieron realizar el análisis lineal discriminante, por lo que finalmente se utilizaron únicamente los 6 primeros componentes principales de los espectros infrarrojos, que presentaron una varianza entre grupos aceptable. Como se verá posteriormente, estos 6 componentes principales, junto con el resto de parámetros, demostraron contener suficiente información para la diferenciación entre los grupos.

Con el objetivo de verificar si, al igual que ocurría con los azúcares y compuestos volátiles, la diferenciación entre escalas se hacía más acusada al aumentar el número de saca, se fueron eliminando las muestras correspondientes a las primeras sacas, para ver

si la clasificación mejoraba sin esas muestras. Al utilizar todos los parámetros, se observó que el 100 % de clasificación se consiguió al eliminar únicamente las dos primeras sacas. Esto se justifica por la gran cantidad de información proporcionada por el conjunto de parámetros. Los resultados del análisis lineal discriminante se muestran en la *tabla 46* y en la *figura 51*. En el modelo obtenido se incluyen variables pertenecientes a los cuatro grupos de parámetros estudiados. Las variables como mayor poder de discriminación fueron galactosa, el segundo componente principal de infrarrojos, poder antioxidante y 2-feniletanol. Si se compara este modelo global con la clasificación por escalas que se realizó usando sólo los compuestos volátiles, se observa que succinato de dietilo y 2-feniletanol están presentes en ambos modelos, lo que nos confirma su estrecha relación con el envejecimiento. En relación a la clasificación usando sólo los azúcares, no aparece aquí la arabinosa, sin embargo sí está la galactosa, compuesto al que ya se atribuyó cierta relación con el envejecimiento.

Escala de envejecimiento	Porcentaje correcto	P	G	T	S
P	100,00	4	0	0	0
G	100,00	0	7	0	0
T	100,00	0	0	5	0
S	100,00	0	0	0	5
Total	100,00	4	7	5	5

Tabla 46: Matriz de clasificación para la diferenciación entre escalas a partir de la saca 3 (S: Solera, P: Primera Criadera, G: Segunda Criadera, T: Tercera Criadera).

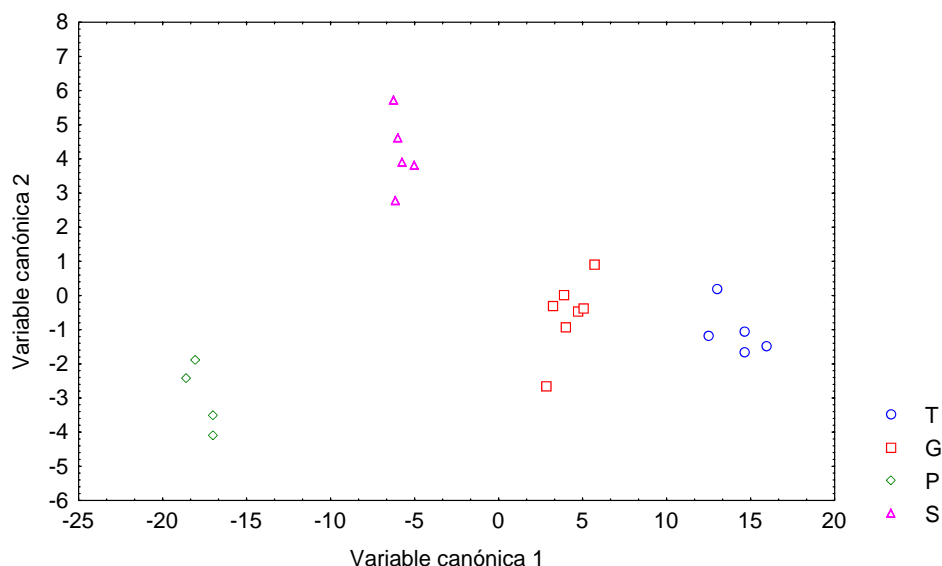


Figura 51: Análisis canónico de la diferenciación por escalas (S: Solera, P: Primera Criadera, G: Segunda Criadera, T: Tercera Criadera).

Como etapa posterior a la diferenciación entre escalas de envejecimiento, se estudiará la clasificación de los brandies según la categoría comercial de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva. Los resultados del análisis lineal discriminante se muestran en la *tabla 47* y en la *figura 52*. En este caso, la combinación de todos los parámetros se traduce en una clasificación del 100 %. Esto supone una mejora importante con respecto a las clasificaciones realizadas a partir de los parámetros por separado, que en ningún caso llegaron al 100 % de clasificación. La mejora más significativa en la diferenciación se observa en el grupo Solera Gran Reserva, que poseía los porcentajes de clasificación más bajos cuando se usaron los parámetros por separado. Al igual que ocurría en la diferenciación por escalas, todas las grupos de parámetros intervienen de alguna forma en este modelo. Las variables con mayor poder de discriminación fueron arabinosa y el tercer componente principal de infrarrojos, aunque, en este caso, todas las variables contribuyen al modelo de forma similar. El succinato de dietilo y los alcoholes isoamílicos también aparecían en la diferenciación por categorías usando sólo los compuestos del aroma. Estos dos compuestos demostraron entonces el mayor poder de discriminación en relación al resto de

compuestos volátiles utilizados. En el caso de los azúcares, ahora sí se incluye la arabinosa, muy relacionada con el tiempo de envejecimiento.

	Porcentaje correcto	S	SR	SGR
S	100,00	10	0	0
SR	100,00	0	11	0
SGR	100,00	0	0	2
Total	100,00	10	11	2

Tabla 47: Matriz de clasificación para la diferenciación entre categorías comerciales (S: Solera, SR: Solera Reserva, SGR: Solera Gran Reserva).

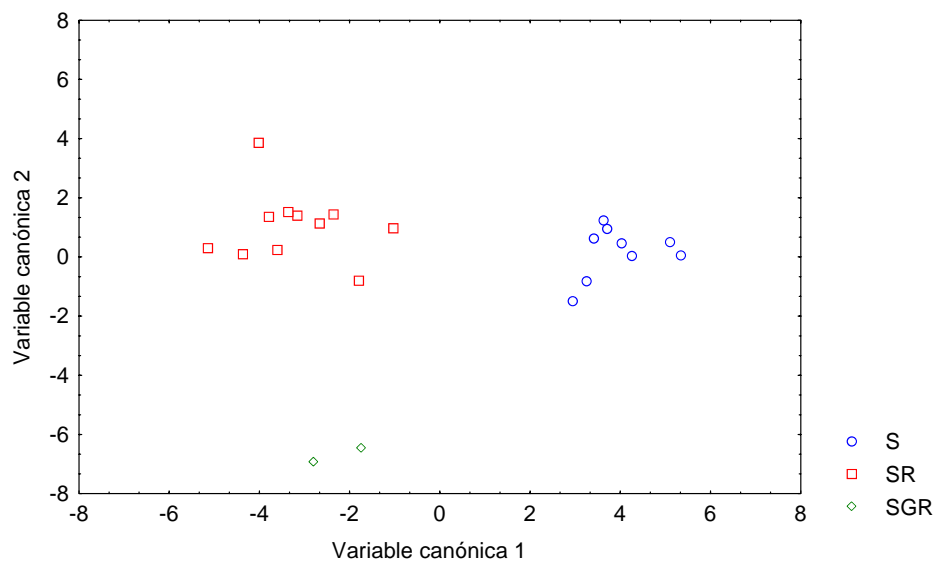


Figura 52: Análisis canónico de la diferenciación por categorías para los brandies del ensayo de envejecimiento.

8.3. PREDICCIÓN DEL TIEMPO MEDIO DE ENVEJECIMIENTO

En vista de los buenos resultados obtenidos usando el conjunto de variables, la siguiente etapa, al igual que en anteriores capítulos, fue realizar una regresión para predecir el tiempo medio de envejecimiento a partir de todos los parámetros medidos en los brandies del ensayo de envejecimiento. Para ello se utilizará la regresión de mínimos cuadrados parciales. Como resultado de la regresión, se obtuvo un modelo con 4 factores, cuyos parámetros se resumen en la *tabla 48*.

	Pendiente	Ordenada en el origen	Coefficiente de correlación	Error cuadrático medio
Calibración	0,86	0,16	0,92	0,25
Validación	0,90	0,12	0,87	0,35

Tabla 48: Parámetros de la regresión por mínimos cuadrados parciales para la predicción del tiempo medio de envejecimiento (años) a partir de las concentraciones de azúcares.

Las variables con mayor contribución al modelo serán aquellas cuyos *loadings* sean más elevados en los primeros factores, que son los que explican una mayor parte de la varianza. Según este criterio, los componentes principales de infrarrojos tuvieron una contribución muy pequeña al modelo, mientras que el resto de parámetros demostró una contribución mayor. Entre ellos, se destacan algunas variables como los alcoholes isoamílicos, el octanoato de etilo, el succinato de dietilo y el 1-propanol. Entre los azúcares, la mayor contribución se debe a la glucosa, seguida de arabinosa.

Para la predicción del tiempo medio de envejecimiento también se utilizaron las redes neuronales, que dieron buenos resultados en las regresiones realizadas en capítulos anteriores. Para ello, es necesario optimizar la topología de la red para esta regresión. Al igual que se hizo en las clasificaciones, se utilizaron los 6 primeros componentes principales del espectro infrarrojo, con el objetivo de reducir el número de neuronas de la capa de entrada y con ello la complejidad del modelo. De esta forma, se utilizaron 22 variables, que darán lugar a 22 neuronas en la capa de entrada a la red neuronal. En la optimización se utilizará un número máximo de 100000 ciclos y 100 ciclos sin mejora para detener la iteración. El primer paso fue la optimización del número de neuronas de la capa oculta, que se ensayó entre 2 y 10 neuronas, ya que un número más elevado de las mismas daría lugar a modelos con riesgo de sobreajuste (*tabla 49*). Como se observa en la parte superior de la tabla, las diferencias en los

valores de error cuadrático medio en función del número de neuronas fueron muy pequeñas, por lo que se seleccionaron 4 neuronas para la capa oculta. Este número de neuronas se eligió como un compromiso entre valores bajos de error cuadrático medio y una topología de red relativamente sencilla. Posteriormente, se optimizó la velocidad de aprendizaje, cuyos valores fueron ensayados entre 0,5 y 1. La topología óptima se obtuvo con una velocidad de 0,9. De esta forma, la red neuronal optimizada consta de una topología 22-4-1 con una velocidad de aprendizaje de 0,9 y un RMSEP de 0,0317 años, que corresponde a un tiempo de envejecimiento de una semana y media, aproximadamente. Estos resultados son muy prometedores, pues no hay que olvidar que los rangos de edad con los que se ha trabajado van de 3 meses a 5 años.

Neuronas capa oculta	Velocidad aprendizaje	RMSEP validación cruzada
2	0,7	0,0393
3	0,7	0,0397
4	0,7	0,0367
5	0,7	0,0364
6	0,7	0,0334
7	0,7	0,0336
8	0,7	0,0373
9	0,7	0,0367
10	0,7	0,0364
4	0,5	0,0399
4	0,6	0,0357
4	0,8	0,0333
4	0,9	0,0317
4	1	0,0330

Tabla 49: Optimización de la topología de una red neuronal artificial para la predicción del tiempo medio de envejecimiento (topología óptima en negrita).

A partir de los resultados obtenidos, se confirma la capacidad de las redes neuronales para combinar la información proporcionada por las distintas variables utilizadas y conseguir una predicción del tiempo medio de envejecimiento considerablemente superior que la obtenida utilizando los parámetros por separado (ya

sea mediante redes neuronales o regresión por mínimos cuadrados parciales) y también superior a la obtenida mediante la regresión clásica (mínimos cuadrados parciales) del conjunto de parámetros medidos. En términos químicos, las familias de parámetros medidas (azúcares, compuestos volátiles, poder antioxidante y espectro infrarrojo) demostraron una elevada relación con el tiempo medio de envejecimiento del brandy, que se pone de manifiesto en las regresiones y clasificaciones obtenidas, confirmando su validez como marcadores de envejecimiento.

8.4. DIFERENCIACIÓN DE *BRANDIES DE JEREZ* COMERCIALES

La última etapa de este trabajo fue la de aplicar todos los parámetros medidos en *Brandies de Jerez* comerciales para su diferenciación en función de las categorías comerciales de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva. En este caso, no se detectaron grupos con varianza cero, por lo que se utilizaron los 20 primeros componentes principales de espectro infrarrojo, que fueron elegidos previamente en las clasificaciones a partir de los espectros infrarrojos. Los resultados se muestran en la *tabla 50* y en la *figura 53*. La contribución del espectro infrarrojo es mayor que en casos anteriores, tanto en el número de componentes principales de infrarrojos incluidas en el modelo, como en el peso de las mismas, ya que el mayor poder de discriminación se atribuye al primer componente principal de infrarrojos. Aparte de los componentes principales de infrarrojos, también se incluyó en el modelo el 2-feniletanol. Este alcohol superior fue la variable de mayor poder de discriminación en la diferenciación por escalas de envejecimiento de los brandies del ensayo experimental y en la clasificación de los *Brandies de Jerez* comerciales en función de las categorías (Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva), ambas realizadas a partir de la composición volátil únicamente. También fue incluido en el modelo de diferenciación entre escalas de los brandies del ensayo experimental realizada a partir de todos los parámetros estudiados en este capítulo. Esta elevada participación del 2-feniletanol en las funciones de clasificación, tanto en *Brandies de Jerez* como en los procedentes del ensayo experimental, revela su estrecha relación con el envejecimiento.

Los resultados obtenidos para *Brandies de Jerez* comerciales suponen una mejora considerable en relación al tratamiento de los parámetros por separado. La imposibilidad del modelo para clasificar el 100 % de las muestras Solera Reserva confirma el solapamiento entre categorías, característico de este grupo de muestras, al que se atribuyeron los bajos porcentajes de clasificación del grupo Solera Reserva en el

tratamiento por separado de los parámetros. Los porcentajes de clasificación obtenidos son ligeramente superiores a los descritos por Hitos, P. et al.⁸, que realizan una diferenciación de *Brandies de Jerez* según categorías (Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva) a partir de varias familias de compuestos, entre los que se encuentran azúcares, compuestos volátiles, compuestos polifenólicos, etc. También en este caso, los porcentajes de clasificación menores correspondieron a los *Brandies de Jerez* Solera Reserva, hecho que también es atribuido por los autores al solapamiento existente entre las categorías.

	Porcentaje correcto	S	SR	SGR
S	100	13	0	0
SR	88,89	1	8	0
SGR	100	0	0	12
Total	97,06	14	8	12

Tabla 50: Matriz de clasificación para la diferenciación entre categorías comerciales (S: Solera, SR: Solera Reserva, SGR: Solera Gran Reserva).

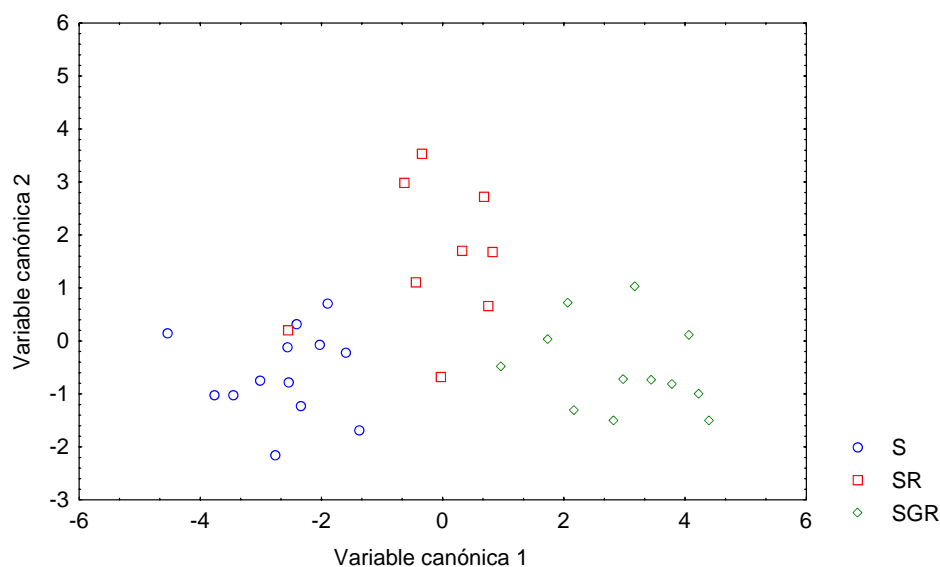


Figura 53: Análisis canónico de la diferenciación por categorías para los Brandies de Jerez comerciales (Solera \circ ; Solera Reserva \square ; Solera Gran Reserva \diamond).

La diferenciación de los *Brandies de Jerez* en función de las categorías comerciales también se ensayó mediante redes neuronales, con la consiguiente optimización previa de la red neuronal para este problema concreto. En el caso de los espectros infrarrojos, y con el objetivo de reducir el número de nodos de entrada a la red, se utilizaron los 13 primeros componentes principales ya que, aunque en un principio se utilizasen todas para el LDA por categorías, se observó que los componentes principales 14-20 no fueron incluidas en el modelo, por tanto su eliminación generó resultados idénticos en el LDA y por tanto permitió reducir el número de variables de partida para la red neuronal, que fueron un total de 24. En la optimización de la red, que se realizó mediante validación cruzada, el número máximo de ciclos fue de 20.000, con 30 ciclos sin mejora para detener la iteración. Según se recoge en la *tabla 51* y utilizando como criterio el porcentaje de clasificación promedio de los tres grupos, la red neuronal que emplea tres neuronas en la capa oculta es la que genera unos porcentajes de clasificación mayores, por tanto se consideró que tres era el número óptimo de neuronas para la capa oculta. En relación a la optimización de la velocidad de aprendizaje, los mejores resultados correspondieron a una velocidad de 0,8 aunque fueron muy parecidos a los obtenidos con una velocidad de 0,7. De esta forma, la topología óptima de la red es 24-3-3 con una velocidad de aprendizaje de 0,8.

Neuronas capa oculta	Velocidad de aprendizaje	Porcentaje correcto de clasificación			
		S	SR	SGR	Promedio
2	0,7	93,33	72,22	88,10	84,55
3	0,7	93,33	75,00	92,86	87,06
4	0,7	88,89	72,22	85,71	82,27
5	0,7	88,89	80,55	80,95	83,46
6	0,7	86,67	75,00	85,71	82,46
7	0,7	91,11	72,22	85,71	83,01
8	0,7	93,33	72,22	90,48	85,34
9	0,7	88,89	72,22	90,48	83,86
10	0,7	88,89	75,00	90,48	84,79
3	0,5	88,89	72,22	88,10	83,07
3	0,6	91,11	75,00	83,33	83,15
3	0,8	93,33	80,55	88,09	87,33
3	0,9	93,33	77,78	88,09	86,40
3	1	88,89	77,78	90,48	85,71

Tabla 51: Optimización de la topología de una red neuronal para clasificar los *Brandies de Jerez* comerciales según las categorías de Solera, Solera Reserva y Solera Gran Reserva (topología óptima con sombreado azul oscuro).

En este caso, vuelve a ocurrir que los peores porcentajes de clasificación correspondieron a los *Brandies de Jerez* Solera Reserva, hecho que se ha justificado anteriormente por el solapamiento entre categorías que existe en los *Brandies de Jerez* comerciales. Los porcentajes de clasificación obtenidos mediante redes neuronales artificiales fueron más bajos que los conseguidos mediante LDA, por tanto se consideró el análisis lineal discriminante como una técnica estadística más apropiada para la diferenciación de los *Brandies de Jerez*. No obstante, las clasificaciones realizadas mediante ambas técnicas se consideran aceptables y contribuyen a poner de manifiesto la relación entre los parámetros estudiados y la edad del brandy.

- Entre los azúcares del sistema experimental de envejecimiento, los más relacionados con el envejecimiento resultaron ser arabinosa y galactosa. El origen de estos compuestos está en el envejecimiento (ya sea a partir de la propia madera o bien del envinado), como se confirma en la bibliografía, que describe aumentos en las cantidades de ambos compuestos durante el envejecimiento. Con excepción de la arabinosa, que se encuentra en los extracto de roble no tostado, estos dos azúcares no están presente en ninguno de los extractos, caramelos y demás sustancias adicionadas al brandy después del envejecimiento, por tanto podrían considerarse marcadores del envejecimiento del brandy.
- En relación a los compuestos volátiles, succinato de dietilo, alcohol isoamílico y 2-feniletanol demostraron estas estrechamente relacionados con el tiempo de envejecimiento en los brandies del sistema experimental. En los *Brandies de Jerez* comerciales, los compuestos más relevantes fueron 2-feniletanol (común a ambos tipos de brandies), isobutanol y butanol. El alcohol isoamílico, 2-feniletanol, isobutanol y 1-butanol son alcoholes superiores, es decir, se trata de los alcoholes más abundantes en los destilados de vino, por tanto estamos hablando de compuestos mayoritarios cuya determinación sería aplicable al análisis de rutina o al control de calidad en la elaboración del brandy. En cuanto al succinato de dietilo, los resultados obtenidos confirman los datos de la bibliografía, en la que se establece el envejecimiento como principal fuente de succinato de dietilo, ya sea a partir de la propia madera de las botas o del envinado de las mismas.
- El poder antioxidante también ha demostrado estar relacionado con el tiempo de envejecimiento, aunque no de una forma tan clara como los azúcares y compuestos volátiles, sin embargo, los resultados obtenidos indican que el poder antioxidante aporta cierta información complementaria sobre el envejecimiento. Esto es cierto para los brandies del ensayo experimental y para los comerciales, no obstante para estos últimos hay que tener en cuenta que existe una cierta aportación de poder antioxidante por parte de las sustancias adicionadas a los brandies después del envejecimiento, por lo que su origen no estaría únicamente en las botas.
- El espectro infrarrojo ha demostrado, a través de la participación de varios de sus componentes principales en los tratamientos estadísticos globales (y a los resultados obtenidos usando únicamente el espectro infrarrojo), tener la capacidad para reflejar, de forma global, los cambios experimentados por el brandy durante el envejecimiento. Este parámetro requiere un tratamiento de datos más complejo que el resto de parámetros estudiados, hecho que se

encuentra compensado por la facilidad de su adquisición y los buenos resultados obtenidos.

9. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Waters "Waters 410 Refractometer. Operators Guide".
- ² Vérette, E., Qian, F. & Mangani, F. (1995) On-line dialysis with high-performance liquid chromatography for the automated preparation and analysis of sugars and organic acids in foods and beverages. *J. Chromatogr. A* **705**, 195-203.
- ³ Rodríguez, M. D., Villanueva, M. J. & Redondo, A. (1999) Effects of processing conditions on soluble sugars content of carrot, beetroot and turnip. *Food Chem.* **66**, 81-85.
- ⁴ Dzhapoladyan, L. M., Mndzhoyan, E. L., Saakyan, R. G. & Akhnazaryan, F. A. (1969) Changes in the carbohydrates of oak fibres in an ethanol medium. *Vinodel. Vinograd. SSSR* **29**, 13-16.
- ⁵ Lafon, J. (1971) Current problems of the technology and aging of brandies of wine and grape dregs. *Bull. Off. Int. Vigne Vin.* **44**, 339-355.
- ⁶ Reazin, G. H. (1981) Chemical mechanisms of whiskey maturation. *Am. J. Enol. Vitic.* **32**, 283-289.
- ⁷ Black, R. A. & Andreasen, A. A. (1974) *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **57**, 111-117.
- ⁸ Hitos, P., Pons, A., Hinojosa, M. I. M., Lombardero, J., Camacho, S. & Dapena, P. (1995) Étude sur la caractérisation analytique du Brandy de Jerez. *Bulletin de LO. I. V.* **775-776**, 746-760.
- ⁹ Blanco, D., Muro, D. & Mangas, J. J. (2003) Evolution of sugars in cider brandy aged in oak barrels: a contribution to its characterization. *J. Agric. Food Chem.* **51**, 923-926.
- ¹⁰ Coimbra, M. A., Barros, A., Barros, M., Rutledge, D. N. & Delgadillo, I. (1998) Multivariate analysis of uronic acid and neutral sugars in whole pectic samples by FT-IR spectroscopy. *Carbohydrate Polymers* **37**, 241-248.
- ¹¹ Pérez-Arquillué, C., Conchello, P., Ariño, A., Juan, T. & Herrera, A. (1995) Physicochemical attributes and pollen spectrum of some unifloral Spanish honeys. *Food Chem.* **54**, 167-172.
- ¹² Low, N. H. (1996) Determination of fruit juice authenticity by capillary gas chromatography with flame ionization detection. *J. AOAC Int.* **79**, 724-737.
- ¹³ Kerhervé, P., Charrière, B. & Gadel, F. (1995) Determination of marine monosaccharides by high-pH anion exchange chromatography with pulsed amperometric detection. *J. Chromatogr. A* **718**, 283-289.
- ¹⁴ Carrera, C. Estudio de los subproductos de la vinificación. Polisacáridos de las lías del vino de Jerez. *Trabajo de Investigación*. Universidad de Cádiz, 2001.
- ¹⁵ Mosedale, J. R. & Puech, J. L. (1998) Wood maturation of distilled beverages. *Trends in Food Sci. & Technol.* **9**, 95-101.
- ¹⁶ Wilford, L.G., Sabarez, H. & Price, W.E. (1997) Kinetics of carbohydrate change during dehydration of d'Agen prunes. *Food Chem.* **59**, 149-155.
- ¹⁷ Cinquanta, L., Di Matteo, M. & Esti, M. (2002) Physical pre-treatment of plums (*Prunus domestica*). Part 2. Effect on the quality characteristics of different prune cultivars. *Food Chem.* **79**, 233-238.
- ¹⁸ Ratsimba, V., García Fernández, J.M., Defaye, J., Nigay, H. & Voilley, A. (1999) Qualitative and quantitative evaluation of mono- and disaccharides in D-fructose, D-

- glucose and sucrose caramels by gas-liquid chromatography-mass spectrometry Di-D-fructose dianhydrides as tracers of caramel authenticity. *J. Chromatogr. A* **844**, 283-293.
- ¹⁹ Dionex Corp. Analysis of carbohydrates by High Performance Anion Exchange Chromatography with Pulsed Amperometric Detection (HPAE-PAD). *Dionex Technical Note* **20**, 1-13.
- ²⁰ Šimkovic, I., Šurina, I. & Vričan, M. (2003) Primary reactions of sucrose thermal degradation. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **70**, 493-504.
- ²¹ Webb, A.D. (1967) "Wine flavour: Volatile aroma components of wines. The chemistry and Physiology of Flavors" Schultz, H.W., Day, E.A. & Libbey, L.M. *Avi Publ. Co.*, Westport, Conn.
- ²² Liebich, H.M., Koenig, W.A. & Bayer, E. (1970) Analysis of the flavor of rum by gas liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chrom. Sci.* **8**, 527-533.
- ²³ Guymon, J.F. & Crowell, E.A. (1972) GC-separated brandy components derived from French and American oaks. *Am. J. Enol. Vitic.* **23**, 114-120.
- ²⁴ Onishi, M., Guymon, J.F. & Crowell, E.A. (1977) Changes in some volatile constituents of brandy during aging. *Am. J. Enol. Vitic.* **28**, 152-158.
- ²⁵ Álvarez, M.A., Trillo, L.M., Pinedo, J.M., Arnedo, R., Casas, J.A. & Sanz, J. Influencia del "envinado" en el perfil analítico del "Brandy de Jerez". *XI Congreso Nacional de Enólogos*. Toledo, 2005.
- ²⁶ Carrascal, V. Estudio de los ácidos orgánicos en Brandy de Jerez y su relación con las prácticas tradicionales de elaboración. *Tesis Doctoral*. Universidad de Cádiz, 2003.
- ²⁷ Cutzach, I., Chatonnet, P., Henry, R. & Dubourdieu, D. (1997) Identification of volatile compounds with a "toasty" aroma in heated oak used in barrelmaking. *J. Agric. Food Chem.* **45**, 2217-2224.
- ²⁸ Ledl, F., Schnell, W. & Severin, Th. (1976) Nachweis von 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one in Lebensmitteln. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* **160**, 367-370.
- ²⁹ Nishibori, S. & Kawakishi, S. (1994) Formation of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one from fructose and β -alanine under conditions used for making. *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1080-1084.
- ³⁰ Kim, M. & Baltes, O. (1996) On the role of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4(H)-pyran-4-one in the Maillard reaction. *J. Agric. Food Chem.* **44**, 282-289.
- ³¹ Barroso, C.G., Rodríguez, M.C., Guillén, D.A. & Pérez-Bustamante, J.A. (1996) Analysis of low molecular mass phenolic compounds, furfural and 5-hydroxymethylfurfural in Brandy de Jerez by HPLC-DAD with direct injection. *J. Chromatogr. A* **724**, 125-129.
- ³² Guillén, D.A., Barroso, C.G., Zorro, L., Carrascal, V. & Pérez-Bustamante, J.A. (1998) Organic acid analysis in Brandy de Jerez by exclusion chromatography, post-column buffering and conductimetric detection. *Analisis* **26**, 186-189.
- ³³ Fengel, D. & Wegener, G. (1989) *Wood Chemistry, ultrastructure, reactions*. Berlin, Walter de Gruyter & Co.
- ³⁴ Jeurings, H.J. & Kupperts, F.J.E.M. (1980) High performance liquid chromatography of furfural and hydroxymethylfurfural in spirits and honey. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* **63**, 1215-1218.
- ³⁵ Pons, I., Garrault, C., Jaubert, J.N. & Morel, J. (1991) Analysis of aromatic caramel. *Food Chem.* **39**, 311-320.

-
- ³⁶ Alonso, A.M., Guillén, D.A. & Barroso, C.G. (2003) Development of an electrochemical method for the determination of antioxidant activity. Application to grape-derived products. *Eur. Food Res. Technol.* **216**, 445-448.
- ³⁷ Palma, M. & Barroso, C. G. (2002) Application of FT-IR spectroscopy to the characterisation and classification of wines, brandies and other distilled drinks. *Talanta* **58**, 265-271.
- ³⁸ Palacios-Santander, J.M., Jiménez-Jiménez, A., Cubillana-Aguilera, L.M., Naranjo-Rodríguez, I. & Hidalgo-Hidalgo de Cisneros, J.L. (2003) Use of artificial neural networks, aided by methods to reduce dimensions, to resolve overlapped electrochemical signals. A comparative study including other statistical methods. *Microchim. Acta* **142**, 27-36.

CAPÍTULO IV: **CONCLUSIONES**

Atendiendo a los resultados obtenidos en la presente memoria, se pueden enumerar las siguientes conclusiones:

a) En relación a las metodologías analíticas:

- El sistema de separación mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta eficacia acoplada con detección amperométrica de pulsos ha sido el método seleccionado, por su elevada sensibilidad y selectividad, así como por los bajos límites de detección obtenidos para la determinación de azúcares en las muestras procedentes de la experiencia de envejecimiento. Además, esta técnica requiere una escasa preparación de muestra y consume un tiempo reducido de análisis, que consiste prácticamente en el tiempo empleado en la separación cromatográfica.
- El detector de índice de refracción, con separación mediante cromatografía de adsorción en fase normal, no ha resultado aplicable a la determinación de azúcares en los brandies del ensayo de envejecimiento, sin embargo, sí resulta apropiado para la determinación de azúcares mayoritarios en *Brandies de Jerez* comerciales y destilados de distintos orígenes.
- Para la determinación del perfil aromático de los brandies, ha sido validado el sistema de separación mediante cromatografía de gases capilar con posterior detección por espectrometría de masas. La ausencia de la etapa de preparación de muestra reduce en gran medida el tiempo de análisis y aumenta la aplicabilidad de esta técnica al control de procesos.
- Para la medida del poder antioxidante en brandy, ha sido validado el dispositivo desarrollado en el grupo de investigación, basado en la generación del catión-radical cromóforo de larga vida ABTS^{•+} por oxidación en el ánodo del ABTS.

b) En relación al envejecimiento del *Brandy de Jerez*:

- Se ha determinado la evolución del perfil de azúcares del brandy durante el envejecimiento dinámico y estático. En el caso del envejecimiento dinámico, los azúcares demostraron una evolución clara, con una tendencia inicial al aumento, seguida de una estabilización y ligera disminución en las concentraciones. Esta evolución se traduce en los buenos resultados obtenidos para la diferenciación de los brandies según escalas de envejecimiento y categorías comerciales, además de demostrar una elevada correlación con el tiempo de envejecimiento. En el envejecimiento estático, las concentraciones de azúcares aumentaron durante los cinco años que duró el ensayo de envejecimiento. Los azúcares más relacionados con el envejecimiento fueron arabinosa y galactosa. El origen de estos compuestos se ha descrito en el envejecimiento (ya sea a partir de la propia madera o bien del envinado).
- Se ha observado un cambio importante en el perfil de azúcares al pasar de brandies del ensayo de envejecimiento a *Brandies de Jerez* comerciales. Mientras que, en el primero de los casos, los cinco azúcares estudiados estuvieron presentes en cantidades similares, en los *Brandies de Jerez* comerciales los cromatogramas estuvieron dominados por glucosa y fructosa, cuyas cantidades fueron superiores en varios órdenes de magnitud a las de ambos azúcares en la solera piloto. Este cambio en el perfil se ha asociado a la adición de las maceraciones de pasas y vinos dulces.
- El perfil aromático de los *Brandies de Jerez* comerciales y del sistema experimental de envejecimiento revela que los ésteres hexanoato de etilo y octanoato de etilo, junto con el ácido octanoico, sólo se encontraron en brandies del ensayo de envejecimiento, mientras que DDMP, glicerina, tartrato de dietilo, hidrógeno succinato de etilo y 5-hidroximetilfurfural fueron exclusivos de los *Brandies de Jerez* comerciales. En general, las concentraciones de los compuestos volátiles estudiados fueron mayores en los brandies procedentes del ensayo de envejecimiento que en los *Brandies de Jerez* comerciales, con excepción del succinato de etilo, que presentó valores medios ligeramente superiores en estos últimos.
- La evolución del contenido en compuestos volátiles durante el envejecimiento no siguió un patrón tan claro como en el caso de los azúcares. Sin embargo, las variaciones en las cantidades de estos compuestos durante el envejecimiento dieron buenos resultados en la

diferenciación de las escalas de envejecimiento y categorías comerciales, así como en la predicción del tiempo medio de envejecimiento. Los compuestos más relacionados con el tiempo de envejecimiento fueron succinato de dietilo (cuyo origen se sitúa en el envejecimiento), alcohol isoamílico y 2-feniletanol en los brandies del sistema experimental. En los *Brandies de Jerez* comerciales, los compuestos más relevantes fueron 2-feniletanol (común a ambos tipos de brandies), isobutanol y butanol. El alcohol isoamílico, 2-feniletanol, isobutanol y 1-butanol son alcoholes superiores, cuya determinación sería aplicable al análisis de rutina o al control de calidad en la elaboración del brandy.

- El poder antioxidante también ha demostrado estar relacionado con el tiempo de envejecimiento, aunque esta relación no ha sido tan evidente como en el caso de azúcares y compuestos volátiles. Los resultados obtenidos indican que el poder antioxidante ofrece cierta información complementaria sobre el envejecimiento, tanto para los *Brandies de Jerez* comerciales como para los del ensayo experimental. Para ambos grupos de muestras, el poder antioxidante aumentó al pasar de brandies Solera a Solera Reserva y de éstos a los Solera Gran Reserva. El poder antioxidante de los *Brandy de Jerez* comerciales fue en general superior a de los del ensayo experimental, hecho que se atribuyó en cierta medida a las sustancias de adición. Por este motivo, el origen de este parámetro no estaría únicamente en el envejecimiento en barrica. Entre los extractos y caramelos estudiados, la mayor aportación de poder antioxidante la realizan los extractos de ciruela pasa, almendra, roble A y C, y vainilla, junto con los caramelos de glucosa y sacarosa. De la comparación del poder antioxidante de *Brandy de Jerez* comerciales y destilados de distintos orígenes, se observó que los *Brandies de Jerez* Solera Reserva presentaron valores de poder antioxidante similares a los encontrados en coñacs y brandies españoles de otros orígenes.
- El espectro infrarrojo constituye, junto con el poder antioxidante, un indicador global, ya que refleja la contribución de muchos compuestos presentes en el brandy. El espectro infrarrojo en el rango $900\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ ha sido capaz de reflejar, de forma general, los cambios experimentados durante el envejecimiento por *Brandies de Jerez* comerciales y de la solera piloto. Este parámetro presenta como inconveniente una carga adicional de tratamiento estadístico, que sin embargo se ve compensada por la sencillez y rapidez asociadas a su adquisición de datos. Los buenos resultados obtenidos, lo harían por ello potencialmente aplicable al control de calidad en la elaboración del brandy. Entre las técnicas

estadísticas utilizadas para el tratamiento del espectro infrarrojo, las redes neuronales artificiales con reducción previa de dimensiones mediante análisis de Fourier demostraron una gran capacidad para modelizar la relación entre el tiempo medio de envejecimiento y el espectro infrarrojo de un brandy, mientras que en los estudios de clasificación, la combinación PCA-LDA dio los mejores resultados.

- Las calibraciones realizadas para estudiar la relación entre el tiempo medio de envejecimiento y los parámetros determinados dieron muy buenos resultados, como lo demuestran los valores de error cuadrático medio de predicción, que estuvieron en el rango 0,15-0,30 años cuando se utilizaron cada uno de los parámetros por separado, y de 0,032 años (una semana y media de tiempo de envejecimiento) cuando se empleó el conjunto de todos los parámetros medidos. Los azúcares, compuestos volátiles y espectro infrarrojo fueron las variables que mostraron una mayor relación con el tiempo medio de envejecimiento. De esta forma, se ha confirmado la validez de determinados parámetros como marcadores de la edad en el *Brandy de Jerez*.
- En relación a las técnicas estadísticas empleadas, las redes neuronales artificiales proporcionaron mejores resultados que las regresiones clásicas por mínimos cuadrados parciales, como se puso de manifiesto a través de errores cuadráticos medios considerablemente menores. En el caso de las clasificaciones, los resultados proporcionados por el análisis lineal discriminante fueron similares o en algunos casos mejores que los obtenidos mediante redes neuronales artificiales. Este aspecto, junto con el aumento en la carga computacional que supone la optimización de la red neuronal, hacen del análisis lineal discriminante una técnica más apropiada para la diferenciación de los brandies, teniendo en cuenta su potencial aplicación al análisis de rutina.